



**DESINFECCIÓN DE *E. coli* K12 EN UNA MATRIZ DE AGUA SUBTERRÁNEA VÍA  
FOTO-FENTON**



**JOHN JAIRO ALVEAR DAZA COD. 0843495**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE-EIDENAR  
ÁREA DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL  
SANTIAGO DE CALI  
2015**

**DESINFECCIÓN DE *E. coli* K12 EN UNA MATRIZ DE AGUA SUBTERRÁNEA VÍA FOTO-FENTON**

**JOHN JAIRO ALVEAR DAZA COD. 0843495**

**TRABAJO DE GRADO**

**Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar por el título de Ingeniero Sanitario y Ambiental**

**DIRECTOR**

**IRMA JANETH SANABRIA GÓMEZ**  
**Lic. PhD., en Microbiología Ambiental**

**CODIRECTOR**

**HÉCTOR MARIO GUTIÉRREZ**  
**Químico. Esp. Ing. Sanitaria y Ambiental. Msc. Candidato a Doctorado**

**ASESOR**

**JULIÁN ÁNDRES RENGIFO HERRERA**  
**PhD., en Química.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA DE LOS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE-EIDENAR**  
**ÁREA DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL**  
**SANTIAGO DE CALI**  
**2015**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

La tesis titulada “DESINFECCIÓN DE *E. coli* K12 EN UNA MATRIZ DE AGUA SUBTERRÁNEA VÍA FOTO-FENTON”, realizada por el estudiante JOHN JAIRO ALVEAR DAZA, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar el título de Ingeniero Sanitario y Ambiental fue evaluada como \_\_\_\_\_, por el jurado evaluador del día \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
Jurado

\_\_\_\_\_  
Jurado

Santiago de Cali, 03 de Septiembre de 2015

## AGRADECIMIENTOS

Prof. Héctor Mario Gutiérrez

Prof. Janeth Sanabria

Prof. Julián Rengifo

Danny Mercedes Acevedo

Grupo GAOX

Familia

Amigos: Karen, Bryan, Diego, M<sup>a</sup> ximena, Dairon, Ronny, Manuel, Ana, Jfelipe, Cindy.

## CONTENIDO

	Pág.
CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	13
1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.....	15
1.1 Antecedentes de la desinfección por foto-Fenton.....	15
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo General .....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 HIPOTESIS .....	16
4 MARCO TEÓRICO.....	17
4.1 Agua Subterránea y Acuíferos .....	17
4.2 Calidad del Agua Subterránea .....	17
4.3 Microorganismo indicador ( <i>E. coli</i> K12).....	18
4.4 Mecanismo de inactivación de las bacterias por agentes oxidantes .....	18
4.5 Estado viable no cultivable – (VBNC).....	19
4.6 FISH .....	20
4.7 Procesos Avanzados de Oxidación - PAOX.....	20
4.8 Reacción foto-Fenton.....	21
4.9 Hierro como catalizador en el proceso Fenton .....	22
4.10 Efecto de los iones en el proceso foto-Fenton.....	23
5 METODOLOGÍA.....	25
5.1 Ubicación.....	25
5.2 Muestras.....	25
5.3 Reactores .....	25
5.4 Determinación del tiempo mínimo de tratamiento.....	25
5.5 Evaluación del efecto de la concentración de hierro, concentración de peróxido y pH en el tratamiento de desinfección vía foto-Fenton en agua Subterránea .....	26
5.6 Comparación de la desinfección con foto Fenton y Cloración de aguas subterráneas .....	27
5.6.1 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 mediante foto- Fenton a pH neutro en agua subterránea.....	27
5.6.2 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 mediante Cloración a pH neutro en agua subterránea.....	27

5.7	Determinación del efecto de los iones presentes en el agua subterránea en la desinfección de <i>E. coli</i> K12 vía foto-Fenton.....	28
5.7.1	Efecto individual de iones.....	28
5.7.2	Ensayo de Iones combinados .....	29
6	RESULTADOS .....	30
6.1	Evaluación del efecto del tiempo sobre la viabilidad y cultivabilidad en el tratamiento foto Fenton a pH neutro .....	30
6.1.1	Seguimiento del recuento de células viables y cultivables .....	30
6.2	Evaluación del efecto de la concentración de hierro, concentración de peróxido y pH en el tratamiento de desinfección vía foto-Fenton en agua Subterránea .....	31
6.3	Comparación de la desinfección con foto Fenton y Cloro de aguas subterráneas .....	32
6.3.1	Determinación de la cinética de desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 mediante foto-Fenton a pH neutro en agua subterránea, utilizando los valores de pH, hierro y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> que fueron favorables del ensayo de factores .....	32
8	Evaluación del efecto de la concentración de CaClO <sub>2</sub> , y pH cercano a la neutralidad en la desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 en agua subterránea mediante Cloración .....	32
8.1.1	Determinación de la cinética de desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 mediante Cloración a pH neutro en agua subterránea .....	33
8.1.2	Evaluación de las eficiencias de desinfección para los procesos foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad y cloración con hipoclorito de calcio (CaClO <sub>2</sub> ) en fuentes de aguas subterránea.....	34
8.2	Determinación del efecto de los iones presentes en el agua subterránea en la desinfección de <i>E. coli</i> K12 vía foto-Fenton.....	34
8.2.1	Efecto individual de iones.....	34
8.2.2	Ensayo de Iones combinados .....	35
8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
8.1	Evaluación del efecto del tiempo sobre la viabilidad y cultivabilidad en el tratamiento foto Fenton a pH neutro .....	37
8.1.1	Seguimiento del recuento de células viables y cultivables .....	37
9	Evaluación del efecto de la concentración de hierro, concentración de peróxido y pH cercano a la neutralidad en la desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 en agua subterránea mediante foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad.....	38
9.1	Comparación de la desinfección con foto Fenton y Cloro de aguas subterráneas .....	40
9.1.1	Determinación de la cinética de desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 mediante foto-Fenton a pH neutro en agua subterránea, utilizando los valores de pH, hierro y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> que fueron favorables del ensayo de factores .....	40

10 Desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 en agua subterránea mediante cloración .....	41
10. Comparación de la diferencia en las eficiencias de desinfección para los procesos foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad y cloración con hipoclorito de calcio ( $\text{CaClO}_2$ ) en fuentes de aguas subterránea .....	43
10.1 Determinación del efecto de los iones presentes en el agua subterránea en la desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 vía foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad .....	43
10.2 Ensayo evaluación del efecto independiente de iones: ( $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{F}^-$ , $\text{SO}_4^{=}$ , $\text{CO}_3^{=}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ ) .....	43
10.3 Ensayo efecto combinado de iones: ( $\text{HCO}_3^-$ , $\text{F}^-$ , $\text{SO}_4^{=}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ ) .....	44
CONCLUSIONES .....	46
RECOMENDACIONES .....	47
BIBLIOGRAFÍA .....	48
ANEXO 1. Demanda de cloro .....	55
ANEXO 2. Diseño experimental para Ensayo de efecto de factores Hierro, pH y Peróxido .....	57
ANEXO 3. Diseño experimental para ensayo de efecto de factores $\text{CaClO}_2$ y pH .....	58
ANEXO 4. Decaimiento de la población celular de <i>E. coli</i> K12 en ensayo de iones efecto individual .....	59
ANEXO 5. Diseño experimental para Ensayo de efecto de iones .....	60
ANEXO 6. Características físico-químicas del agua subterránea corregimiento El Tiple .....	61
Características microbiológicas del agua subterránea corregimiento El Tiple .....	61
ANEXO 7. Comportamiento de la concentración de Hierro y peróxido durante el tratamiento. ....	63
ANEXO 8. Seguimiento a Parámetros de control para las combinación de factores F.F - R4 (pH 6,78 unidades, $\text{H}_2\text{O}_2$ 10 $\text{mgL}^{-1}$ y hierro total 0,3 $\text{mgL}^{-1}$ ) en la desinfección de la cepa <i>E. coli</i> K12 .....	64
ANEXO 9. Analisis ANOVA - Ensayo efecto factores: ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH, Fe total) .....	66
ANEXO 10. ANOVA simple (Ensayo iones: Fluoruros, Cloruros, Fosfatos y Manganeseo) .....	70
ANEXO 11. Analisis ANOVA - Ensayo del efecto de factores: $\text{CaClO}_2$ , pH .....	71
ANEXO 13. Grafica de Pareto para los factores $\text{CaClO}_2$ y pH .....	73
ANEXO 14. Esquemas metodológico para los recuentos celulares por los métodos RCP y DVC-FISH .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Especies de hierro en solución acuosa como una función del pH. Las líneas punteadas indican el rango de pH óptimo de trabajo (2,8-3,2 unidades) para la reacción fenton (tomado de Bokare y Choi., 2014).....	23
Figura 2. Seguimiento de la cultivabilidad y viabilidad a la población celular de <i>E. coli</i> K12 durante el ensayo de pre-cinética para el tratamiento foto Fenton a pH 7,1 unidades en agua subterránea (F.F pH 7,1 – RCP y DVC) y controles Blanco (0,3mgL <sup>-1</sup> Fe total/Oscuridad), Fenton pH 7,1 unidades (Fenton pH 7,1 – RCP y DVC) y Fotólisis (0,3 mgL <sup>-1</sup> Fe total/Irradiación pH 7,1 – RCP y DVC).....	34
Figura 3. Seguimiento de la población celular <i>E. coli</i> K12 en estado viable no cultivable (VBNC) por el método DVC-FISH .....	36
Figura 4. Decaimiento de la población celular de <i>E. coli</i> K12 en ensayo de iones (con concentración de hierro total igual a 0,3mgL <sup>-1</sup> , peróxido de 10mgL <sup>-1</sup> y pH igual a 6,98 unidades).....	38
Figura 5. Seguimiento del porcentaje de inhibición celular en ensayo de iones para los dieciséis experimentos de foto Fenton a pH cercano de la neutralidad con combinación de iones. a) corresponde a la combinación de iones reportada como reactor (R1-R8), b) corresponde a la combinación de iones reportada como reactor (R9-R16), además de los controles; foto Fenton sin iones a pH 7,01 un., Fenton (pH 7,01 un.), Fotólisis sin iones y foto Fenton sin iones pH 2,8 unidades .....	40
Figura 6. DVC-FISH recuento celular e identificación de células elongadas de <i>E. coli</i> K12 en agua subterránea después del proceso foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad, a.) Combinación de iones R16, b.) Combinación de iones R4 .....	42
Figura 7. Porcentaje de inhibición de la cepa <i>E. coli</i> K12 en ensayo de factores peróxido, Hierro y pH cercano a la neutralidad .....	44
Figura 8. <i>E. coli</i> K 12 que presento tamaños promedios entre (10-15µm), ensayo foto-Fenton con Factores pH, hierro en niveles máximos .....	.
Figura 9. Porcentaje de inhibición de la cepa <i>E. coli</i> K12 en ensayo de factores CaClO <sub>2</sub> , y pH cercano a la neutralidad en el tratamiento Cloración .....	47
Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido para la determinación de la significancia de los factores pH (A), Peróxido (B) y Hierro (C) en el porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana <i>E. coli</i> K12 para los tiempo 45 min, 90 min, 180 min, 270 min y 360 min del tratamiento foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad. El valor límite de la significancia está indicado por la línea vertical.....	74
Figura 11. DVC-FISH recuento celular e identificación de células elongadas de <i>E. coli</i> K12 en agua subterránea después del proceso Cloración. ....	50
Figura 12. Cinética inactivación de <i>E. coli</i> K12 mediante foto Fenton a pH neutro en agua subterránea.....	51
Figura 13. Cinética inactivación de <i>E. coli</i> K12 mediante cloración a pH neutro en agua subterránea .....	52
Figura 14. Seguimiento al daño en la membrana celular de <i>E.coli</i> K12 por Scanning electrón microscopy (SEM), a.) Tiempo cero sin elongar, b.) Tiempo cero célula elongada .....	53



Figura 1.1. Seguimiento a la población celular durante el tratamiento Foto-Fenton, en agua Mili-Q mediante (RCP) .....	63
Figura 19. Seguimiento a la población celular de <i>E. coli</i> GW5 durante el tratamiento Foto-Fenton en agua Mili-Q mediante la técnica DVC-FISH .....	64
Figura 24. Grafica de caja y bigotes para %Reducción durante el tratamiento foto-Fenton .....	71
Figura 25. <i>E. coli</i> K 12 que presento tamaños promedios entre (10-15 $\mu$ m), ensayo foto-Fenton con Factores pH, hierro en niveles máximos .....	46
Figura 26. Diagrama de Efectos principales obtenido para la determinación de la significancia los factores pH, peróxido y hierro en el porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana <i>E. coli</i> K12 luego del tratamiento foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad.....	75
Figura 27. Curva de demanda de Cloro dosis optimizada para el agua subterránea tipo.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Antecedentes de la desinfección por fotocátalisis a nivel global .....	15
Tabla 2. Concentración Máxima de Iones utilizada en el ensayo.....	27
Tabla 3. Concentraciones Mínima y Máxima de Iones utilizadas en el ensayo .....	27
Tabla 4. Matriz de experimentos del diseño factorial completo $2^4$ para estudiar el efecto de los iones (el signo (-) hace referencia a la mínima concentración del ion y el signo (+) representa la máxima concentración evaluada).....	28
Tabla 5. Matriz de experimentos del diseño factorial completo $2^3$ para estudiar el efecto de los factores pH, Hierro total y peróxido (el signo (-) hace referencia a la mínima concentración del factor y el signo (+) representa la máxima concentración evaluada) .....	29
Tabla 6. Matriz de experimentos del diseño factorial completo $2^2$ para estudiar el efecto de los factores pH y $\text{CaClO}_2$ (el signo (-) hace referencia a la mínima concentración del factor y el signo (+) representa la máxima concentración evaluada) .....	31
Tabla 7. Caracterización fisicoquímica del agua subterránea evaluada por Mejía (2014) .....	32
Tabla 8. Iones valorados en la caracterización fisicoquímica del agua subterránea Mejía (2014).....	32
Tabla 9. Caracterización del agua subterránea a tratar .....	33
Tabla 10. Tiempo teórico de desinfección completa para los tratamientos foto-Fenton y Cloración en agua subterránea.....	54
Tabla 11. Seguimiento a la población celular nativa en estado VBNC causado por baja temperatura, volumen en stock 15 Litros. ....	65
Tabla 12. Especies de patógenos humanos con aprobado estado VBNC.....	66
Tabla 13. Comportamiento de la la población celular bajo foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad, valores promedio para cultivabilidad y viabilidad .....	.
Tabla 14. Comportamiento de la población celular bajo foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad, efecto iones individuales.....	70
Tabla 15. Anova para %Inhibición de <i>E. coli</i> K12 en 90 minutos .....	71
Tabla 16. Anova para %Inhibición de <i>E. coli</i> K12 en 180 minutos .....	71
Tabla 17. Valores promedio de inhibición celular <i>E. coli</i> K12 (concentración inicial aproximadamente de $10^6$ – $10^7$ UFC.mL <sup>-1</sup> ) obtenido luego de 90 min, 180 min, 270 min, 360 min y 420 min del tratamiento foto Fenton para el diseño factorial $2^4$ de efecto de iones.....	.
Tabla 18. Porcentaje de inhibición celular <i>E. coli</i> K12 (concentración inicial aproximadamente de $10^6$ – $10^7$ UFC.mL <sup>-1</sup> ) obtenido luego de 90 min, 180 min, 90 min, 270 min y 360 min del tratamiento foto Fenton a pH 6,98 unidades, bajo condiciones máximas de pH (7,65 unidades), $\text{H}_2\text{O}_2$ (10 mgL <sup>-1</sup> ) y Hierro total (0,9 mgL <sup>-1</sup> ) (indicado como +) o bajo condiciones mínimas de pH (6,78 unidades), $\text{H}_2\text{O}_2$ (4 mgL <sup>-1</sup> ) y Hierro total (0,3 mgL <sup>-1</sup> ) (indicado como -) .....	.
Tabla 19. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (45 min) .....	72
Tabla 20. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (90 min) .....	72
Tabla 21. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (180 min) .....	73
Tabla 22. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (270 min) .....	73
Tabla 23. Resultados ensayo para determinar la curva de demanda de cloro en la muestra de agua subterránea tipo.....	76

## DESINFECCIÓN DE *E. coli* K12 EN UNA MATRIZ DE AGUA SUBTERRÁNEA VÍA FOTO-FENTON

### RESUMEN

El agua subterránea constituye la fuente más grande de agua dulce disponible (aproximadamente el 96%), proporciona entre el 25 y 40% del agua potable en el mundo. El agua subterránea posee una buena calidad natural, generalmente libre de patógenos, color y turbiedad (National Academy of Sciences 2008). Un riesgo para los acuíferos libres superficiales es la inadecuada disposición de Excretas en sectores rurales, conllevando a la contaminación microbiológica. La desinfección con cloro es el tratamiento más usado para las aguas, sin embargo esta forma de desinfección representa riesgo para la salud humana debido a la generación de subproductos tóxicos cancerígenos denominados DBPS, (Desinfection by-products), como alternativa de control a estos riesgos se evalúan otros métodos de desinfección, siendo los más estudiados los procesos avanzados de oxidación - PAOX.

El presente estudio propone la desinfección en agua subterránea a través del tratamiento foto-Fenton a pH neutro, usando hierro naturalmente presente en el agua subterránea. Se evaluó la influencia de los factores de la composición química del agua, en la desinfección vía foto-Fenton usando como indicador el microorganismo *E. coli* K12, adicionando a una muestra natural proveniente del corregimiento El Tiple. Para determinar la efectividad del proceso de desinfección en aguas subterráneas, se uso recuento directo de bacterias viables con el método de hibridación in-situ con sondas fluorescentes (FISH) combinado con el método de elongación celular en presencia de antibiotico. Los factores químicos evaluados fueron: (i) la interferencia de los iones presentes en la fuente de agua ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), así como (ii) las concentración adecuada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  e hipoclorito de calcio.

Se determinó que la cinética de desinfección, la constante cinética  $k$  es igual a  $-7,56 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  y el tiempo de vida media de la desinfección durante el tratamiento es igual a 135 min. El tratamiento de cloración en agua subterránea mostró un tiempo medio de desinfección de 52,45 min, mostrando que requiere un menor tiempo de contacto para lograr la desinfección comparado con el tratamiento foto-Fenton a pH neutro.

**Palabras Clave:** foto-Fenton, agua subterránea, inactivación microbiológica, *E.coli* K12, pH neutro, DVC-FISH, viabilidad celular, iones, energía solar.

## CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA

Se estima que la distribución de agua a nivel mundial es: 97,5% de agua salada y 2,5% de agua dulce. De la porción de agua dulce el 66,7% corresponde a glaciares, el 30,1% agua subterránea, el 0,8% nieves permanentes y el 0,4% agua superficial y atmosférica (UNESCO, 2004).

De acuerdo con Von Sperling (2012) del agua disponible a nivel mundial, únicamente 0,007% puede ser utilizada fácilmente para abastecimiento público, de esta fracción sólo el 3% es agua superficial y el 97% del agua que podría usarse para consumo humano, es agua subterránea. La disponibilidad de agua superficial para consumo es afectada por la escasez e intervención antropogénica que deteriora su calidad.

El agua subterránea, proporciona globalmente entre el 25% y 40% del agua potable en el mundo, (National Academy of Sciences 2008). En algunos países en vía de desarrollo, los acuíferos libres superficiales constituyen la principal fuente de agua para uso doméstico (Msilimba y Wanda, 2013). En Colombia las reservas de agua subterránea son de 5 848 km<sup>3</sup>, que equivale al 72% del total disponible. En nuestro país el uso anual es de 808 km<sup>3</sup> en actividades agrícola, doméstico e industrial (IDEAM 2010). El agua subterránea es importante en el suministro de agua en las zonas rurales, debido a la oferta de acuíferos disponibles, a la falta de opciones de tratamiento para el agua superficial (Braune y Xu, 2010).

A pesar de su abundancia, los acuíferos experimentan una creciente amenaza de contaminación ocasionada por la urbanización, el desarrollo industrial, las actividades agrícolas y la explotación minera (Foster et al., 2006). Uno de los problemas de la calidad química del agua subterránea es la agricultura debido al uso de grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas (Gutiérrez, 2004). Otro riesgo para los acuíferos libres superficiales es la inadecuada disposición de excretas en sectores rurales lo cual conlleva a la contaminación microbiológica y consecuentemente la transmisión de enfermedades de carácter agudo o crónico. Las enfermedades transmitidas por el agua contribuyen significativamente en los índices de mortalidad prematura a nivel mundial (Fitts, 2002). Por otra parte se ha asociado con la contaminación química el incremento de la incidencia de Parkinson (Gatto et al, 2009) y efectos de disrupción endocrina en la fauna (Taylor y Harrison, 1999).

Existen diferentes propuestas tecnológicas para desinfección de las aguas subterráneas: la micro-filtración, sin embargo esta presenta la desventaja que no es eficaz para remover sustancias orgánicas; la ósmosis inversa, cuya limitación es que no remueve contaminantes como los pesticidas; la destilación, presenta el inconveniente que si el contaminante a remover presenta volatilidad la tecnología no es viable; la radiación ultra violeta, es muy usada pero no es eficiente en la degradación de compuestos orgánicos; eliminación de iones como hierro y manganeso (Ablandamiento por intercambio de iones, Aireación/filtración, Filtro oxidante - zeolita); el tratamiento de adición de cloro, es el tratamiento más usado sin embargo, este tiene como inconveniente en las aguas subterráneas el cambio de estado de oxidación de Fe<sup>-2</sup> a Fe<sup>-3</sup>, generando un color amarillo que afecta la aceptación de los usuarios. Por otra parte la cloración en presencia de materia orgánica natural genera la formación de subproductos tóxicos de desinfección ó DBPS, (Desinfection by-products), estos DBPs tienen una comprobada capacidad tóxica y/o mutagénica para los humanos (Sánchez, 2008).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha generado un creciente interés en la búsqueda de métodos de desinfección alternativo que puedan superar las limitaciones de los convencionales, sin comprometer la seguridad microbiológica del agua. Dentro de estas alternativas se encuentran los procesos avanzados de oxidación -PAOX-; radiación solar, desinfección electroquímica, ozonización, fotocátalisis homogénea y fotocátalisis heterogénea. Que se basan fundamentalmente en la generación de especies reactivas de oxígeno siendo el principal, el radical OH. Las especies reactivas de oxígeno degradan compuestos orgánicos y atacan a los microorganismos ocasionando su inactivación y/o muerte. (Rengifo, 2013)

Este estudio evaluó la desinfección con foto-Fenton en aguas subterráneas de una muestra proveniente del corregimiento en la localidad “El Tiple” en Candelaria - Valle del Cauca adicionando al agua la bacteria *E. coli* K12.

El foto-Fenton es clasificado dentro de los procesos de catálisis homogénea. A pesar de que este proceso se hizo durante muchos años a pH ácido, recientemente se encontró que también puede ocurrir a pH neutro, lo cual es más ventajoso para su potencial aplicación en tratamiento de aguas. Teniendo en cuenta que las aguas subterráneas son naturalmente ricas en hierro se consideró el uso de este factor como ventaja adicional. Se determinó la influencia de algunos factores potencialmente relevantes sobre la desinfección vía foto-Fenton, como la presencia de iones:  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ . El foto-Fenton se comparó con desinfección convencional usando hipoclorito de calcio. Una de los aspectos más discutidos en la literatura es la confiabilidad de los métodos de cultivo en placa para evaluar la muerte bacteriana durante la desinfección. Se ha encontrado que los microorganismos en condiciones de stress oxidativo dejan de ser cultivables aunque conservan sus características vitales y podrían recuperarse una vez suspendido el tratamiento, a esta condición se le ha denominado estado viable no cultivable VNC. Por lo tanto para valorar la muerte celular se llevó a cabo la medición usando dos métodos complementarios. El método de FISH adaptado por DeLong en 1989 y Amman en 1990 (De Long et al., 1989). para identificar especies microbianas no cultivables y propuesto por primera vez por Villarino en el (2000), para evaluar la viabilidad durante la desinfección, combinado con el método DVC (Amann et al., 1990). por sus siglas en inglés “direct viable count” que consiste en la adición trazas de antibiótico a un medio rico en nutrientes. El antibiótico inhibe la generación del septum de división, lo cual hace que las bacterias se dupliquen sin separarse generando la imagen de una única célula elongada.

## 1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

### 1.1 Antecedentes de la desinfección por foto-Fenton

Rincón y Pulgarin reportaron en 2005, la posibilidad de usar el proceso foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad. Moncayo-Lasso et al., en 2009, reportaron la posibilidad de usar aguas reales, con el hierro naturalmente presente, el peróxido de hidrógeno a pH cercano a la neutralidad. A la fecha, la desinfección mediante foto Fenton a pH cercano a la neutralidad en aguas subterráneas ha sido evaluada por Ndounla, et al., en el 2014 b, quienes realizaron la inactivación foto asistida de coliformes totales / *E. coli* y *Salmonella* spp. La Tabla 1 muestra los antecedentes relacionados a la desinfección por fotocatálisis a pH neutro.

Tabla 1 Antecedentes de la desinfección por fotocatálisis a nivel global

Patógeno	Proceso	Matriz de agua	pH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe	Desinfección – Tiempo / Fuente de radiación - Reactor	Referencia
<i>E. coli</i> K12	Foto Fenton	Agua de lago	7.5	10 mg L-1	10 mg L-1	Total inactivación - 3 horas / Luz solar - CPC reactor	Rincón and Pulgarin 2005
<i>E. coli</i> K12	Foto Fenton	Agua de Rio	6.5– 7.0	10 mg L-1	0.6 mg L-1 Fe natural	Total inactivación - 5 horas / Luz solar - CPC reactor	Moncayo-Lasso et al 2009
<i>E. coli</i> & <i>Salmonella</i>	Foto Fenton Sodis-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Agua Subterránea	4.9– 6.3	8.5 mg L-1	0.07 mg L-1 y 0.6 mg L-1	Total inactivación - 120 minutos / Simulador solar y Luz solar - botellas PET	Ndounla et al; 2013
<i>E. coli</i> & <i>Salmonella</i>	Foto Fenton	Agua Subterránea	5.4	4.0 mg L-1	0.07 mg L-1	Total inactivation - 360 minutos / Luz solar - CPC reactor	Ndounla et al 2014a
<i>E. coli</i> & <i>Salmonella</i>	Foto Fenton	Agua Subterránea	4.9-5.1 pozo 1 y 5.6-5.7 pozo 2	10 mg L-1	0.03-0.05 mg L-1 p1 y 0.01-0.04 mg L-1 p2	1 Log (pozo 1) <i>E. coli</i> ; 0 Log (pozo 2) <i>Salmonella</i> - 240 minutos / Luz solar en temporada de lluvia - CPC reactor	Ndounla et al 2014b

Las aguas subterráneas, contienen concentraciones de hierro presentes de forma natural y baja turbiedad (CVC, 2008; Rani y sasidhar, 2011), lo anterior hace factible realizar tratamientos foto Fenton a pH neutro en este tipo de agua.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar las condiciones para lograr la desinfección de *E. coli* K12 en fuentes de agua subterránea usando foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad.

### 2.2 Objetivos Específicos

Determinar el tiempo mínimo de tratamiento con el proceso foto-Fenton para lograr la desinfección de la cepa *E. coli* K12 en aguas subterráneas.

Evaluar el efecto de los factores: concentración de hierro, concentración de peróxido y pH, en el tratamiento foto-Fenton para la desinfección de aguas subterránea.

Comparar las eficiencias de desinfección con foto-Fenton en concentraciones naturales de hierro y pH cercano a la neutralidad y cloración con hipoclorito de calcio ( $\text{CaClO}_2$ ) en agua subterránea

Evaluar el efecto de los iones  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{SO}_4^{=}$ ,  $\text{CO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{-3}$ , en la desinfección con foto-Fenton de la cepa de *E. coli* K12, en fuentes de agua subterránea.

## 3 HIPOTESIS

Se podrá identificar como las características físico-químicas del agua subterránea afectan la desinfección con foto-Fenton cuando esta se realiza a pH cercano a la neutralidad y hierro naturalmente presente en estas.



## 4 MARCO TEÓRICO

### 4.1 Agua Subterránea y Acuíferos

El Agua subterránea es el agua subsuperficial que se encuentra bajo el nivel freático en suelos y formaciones geológicas saturadas, es decir, en la zona de saturación del suelo (Arizabalo y Díaz, 1991). Los acuíferos son las formaciones geológicas donde el agua es almacenada en los poros y circula con facilidad por ellos, de acuerdo a su presión hidrostática, pueden ser libres o confinados.

Los acuíferos libres se presentan cuando el manto freático no está limitado por un estrato impermeable en la parte superior y por lo tanto contienen agua bajo la presión atmosférica; en los acuíferos confinados, el agua subterránea está limitada por un estrato impermeable, a mayor presión que la atmosférica y con una recarga que no es uniforme, en estos acuíferos el agua satura completamente los poros (Jyrkama y Sykes, 2007)

### 4.2 Calidad del Agua Subterránea

El agua subterránea carece de turbidez, aunque puede requerir ablandamiento, la mayoría de patógenos y sustancias indeseables se eliminan, gracias a la acción filtrante de las partículas del suelo. En las aguas subterráneas la composición del hierro puede oscilar entre  $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$  y el manganeso regularmente se encuentra en concentraciones menores a  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  (Hiscock, 2005). Los acuíferos pueden contaminarse si la carga contaminante sub-superficial generada por descargas y lixiviados antropogénicos, excede la capacidad natural de amortiguación del terreno y de los estratos subyacentes (Medina, 2002).

La composición química afecta los usos potenciales del agua. Los factores limitantes para uso doméstico en el agua subterránea son: el hierro (II). El hierro se combina con oxígeno y cambia su estado de oxidación a Hierro (III). El 10% de la ingesta diaria máxima tolerable es de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  por tanto no representa un peligro a la salud, sin embargo a niveles superiores de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  genera color rojizo-café y turbiedad, en esa concentración tiñe la ropa en el lavado y genera rechazo por la de la comunidad, además forma una capa viscosa en la tubería. El Manganeseo (II), a concentraciones superiores de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  cambia de estado de oxidación a Mn (IV), se vuelve insoluble, incrementando la turbidez y forma un precipitado negro, el valor límite para efectos en la salud es de  $0,4 \text{ mgL}^{-1}$ ; la dureza total restringe el uso del agua incrementando el consumo de jabones y detergentes, también genera incrustaciones debido a la dureza carbonática. Concentraciones de Sulfatos mayores a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  generan sabor y tienen un efecto laxante. Las aguas subterráneas pueden ser contaminadas por Nitratos usados en las actividades agrícolas estos se pueden constituir en nutrientes que facilitan el incremento de la población microbiológica y desarrollo de biopelículas, además los Nitratos pueden causar el síndrome del bebé azul, (WHO, 2008).

La eliminación de contaminantes en la zona no saturada del subsuelo está asociada a la degradación biológica, reacciones químicas y la adsorción en la superficie de arcillas minerales y/o



de materia orgánica. La contaminación en el subsuelo depende de factores que controlan la movilidad y persistencia de los contaminantes, originados por la matriz del acuífero y las tasas mucho más lentas de biodegradación (como resultado de las bajas concentraciones de carbón orgánico, la reducida población de bacterias y la limitada difusión de oxígeno). Existe una preocupación especial ligada a la posibilidad de contaminar los acuíferos no confinados, especialmente cuando la zona no saturada es poco profunda y los niveles del agua son someros (Foster et al., 2006).

#### 4.3 Microorganismo indicador (*E. coli* K12)

Debido a la difícil cuantificación y/o enumeración de todos los microorganismos presentes en el agua, el microorganismo indicador más empleado para estudios de desinfección fotocatalítica bacteriana es *Escherichia coli* por ser indicador de la contaminación fecal y presentar facilidad en su aislamiento y manejo. *E. coli* es un microorganismo *gram* negativo, la pared celular tiene una capa de peptidoglicano (2-6 nm de espesor) que representa sólo el 10% de la pared celular y la membrana externa (6-18 nm) se compone de 50% de lipo-polisacáridos, fosfolípidos 35% y 15% de lipoproteínas. Tanto la membrana, el peptidoglicano y el exterior le proporcionan protección mecánica para mantener la morfología de las células intacta (Madigan, et al., 2006).

#### 4.4 Mecanismo de inactivación de las bacterias por agentes oxidantes

En el proceso de desinfección con fotocatálisis las especies reactivas del oxígeno (anión súper óxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos), atacan los microorganismos, especialmente se ha descrito su efecto a nivel de lípidos, proteínas y cadena respiratoria en las bacterias.

Los lípidos son el mayor blanco durante el estrés oxidativo, los radicales pueden atacar directamente los ácidos grasos poliinsaturados en membranas e iniciar la peroxidación lipídica. El primer efecto de peroxidación lipídica es un decrecimiento en la fluidez de la membrana, la cual altera las propiedades de esta, haciendo que se desprendan las proteínas que están unidas a ella, cuando sucede esto se forman más radicales y los ácidos grasos poliinsaturados son degradados generando una variedad de productos como los aldehídos, los cuales son muy reactivos y pueden dañar moléculas como las proteínas. Los aldehídos que se pueden generar son; malonaldehído y 4-hidroxi-alquenos, esto fue confirmado por Ding et al., en el 2011, al aplicar el proceso de fotocatálisis a *E. coli*, los investigadores encontraron el aumento de la concentración del (malonaldehído), durante el tratamiento.

Al continuar hacia la parte más interna de la bacteria, se ha encontrado que puede ocurrir oxidación en las lipoproteínas ocurriendo rompimiento de los enlaces sulfhídricos, es decir las lipoproteínas contienen en su estructura cisteína, el cual contiene enlaces sulfhídricos, y al oxidarse dos enlaces sulfhídricos de cisteína, se genera un producto llamado puente disulfuro (cistina), alterando la estructura bacteriana. Además, los microorganismos tienen mecanismos de protección contra el estrés oxidativo por medio de enzimas como la catalasa y súper óxido dismutasa, pequeñas proteínas como thioredoxin y glutaredoxin y moléculas como glutatión. Por otro lado la respuesta genética bacteriana contra el estrés oxidativo es controlada por dos mayores reguladores

transcripcionales (Oxy R y Sox Rs). Algunas moléculas son presentadas constitutivamente y ayudan a mantener reducido el ambiente intracelular; algunas de estas moléculas son antioxidantes no enzimáticos como NADPH Y NADH, B caroteno, ácido ascórbico,  $\beta$  tocoferol y glutatión. Lo que sucede aquí es que el Glutatión, presentado en altas concentraciones, mantiene una fuerte reducción en el medio ambiente de la célula; esta forma reducida es mantenida por la glutatión reductasa usando NADPH, como un fuerte reductor, en adición enzimas específicas decrecen los niveles del oxígeno reactivo. Estas enzimas específicas son la súper óxido dismutasa la cual transforma el anión súper óxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno y la otra enzima es la catalasa la cual desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Inmediatamente el sistema Oxy R es activado al formarse los puentes disulfuro, inducidos por el peróxido de hidrógeno, la respuesta que se genera a este fenómeno es que la bacteria por medio de la glutaredoxin reduce los puentes disulfuro formados, ocurriendo la autorregulación (Rivera, 2011).

Se encontró que las bacterias *E. coli* y *Salmonella Typhimurium* se vuelven resistentes a altas concentraciones de  $H_2O_2$ , sí previamente fueron tratadas con bajas dosis de este agente oxidante. Esto es debido a que el regulón Oxy R es responsable de la respuesta bacteriana al estrés por  $H_2O_2$ . En este caso, solamente una proteína (Oxy R) sensa el estímulo (aumento de  $H_2O_2$ ), activando la respuesta (induce la expresión de genes). Kat G activa la transcripción de la catalasa, enzima que desdobla el peróxido de hidrógeno, en agua y oxígeno. Otro mecanismo de defensa que utiliza la bacteria al proceso de desinfección es el regulón Sox R sensa el estímulo (estrés por súper oxido) y el regulón Sox s que activa la expresión de genes blanco; como por ejemplo Sod A, el cual activa la transcripción de super oxido dismutasa, enzima que transforma el anión super oxido en  $H_2O_2$  y agua. (Rivera, 2011)

Después puede ocurrir oxidación de la metionina en la lipoproteína, en este hecho el proceso puede ser reversible o irreversible; cuando la metionina se oxida a sulfoxida metionina, una enzima llamada metionina sulfoxido reductasa, corrige la oxidación, pero cuando la metionina se oxida hasta sulfona de metionina, el proceso es irreversible, es decir ninguna enzima corrige el error. Así mismo en la pared bacteriana puede ocurrir oxidación en los enlaces peptídicos. Finalmente en la membrana plasmática ocurre oxidación en los precursores de biosíntesis de pared (exactamente en los enlaces peptídico). Por otro lado para poder llegar a una fase de inhibición o inactivación bacteriana completa con el proceso de desinfección por fotocátalisis se debe oxidar al Acetil coenzima A, para afectar la cadena respiratoria en el ciclo de Krebs y hacer que el proceso sea irreversible. (Rivera, 2011)

#### 4.5 Estado viable no cultivable – (VBNC)

Se ha descrito el estado fisiológico denominado “Viable But Non Culturable” (VBNC) para especies bacterianas normalmente cultivables. Se sabe que varias especies de bacterias entran en el estado VBNC después de ser sometidas a ciertas condiciones de estrés ambiental. La formación de células VBNC ha sido propuesta por algunos como una estrategia de supervivencia, de resistencia al estrés. Otros argumentan que el estado VBNC es una condición moribunda, irreversible, en la que las células se debilitan progresivamente hasta morir. Hasta ahora, la hipótesis más aceptada es que el estado VBNC es una respuesta fisiológica (genéticamente programada) al estrés ambiental, y por lo

tanto reversible; es decir, las células que entran en VBNC deben ser capaces de salir de este estado y ser metabólicamente activas cuando las condiciones son favorables. (Rivera, 2011)

Las células también pueden ser transportados con el agua y la comida y luego a los humanos en los que luego pueden crecer y dividirse, y en el caso de patógenos VBNC pueden causar infecciones y también incluso producir toxinas en el hospedador (Trevors, 2011). Para hacer el cambio de la forma VBNC al estado infeccioso, estas células son capaces de responder a las fluctuaciones de las condiciones ambientales a través de la expresión génica diferencial (Trevors, 2011).

Después de décadas de estudio, es claro que el estado VBNC es tanto una herramienta importante para la supervivencia de las bacterias y un aspecto peligroso de patógenos bacterianos para el huésped. (Lamm Li., 2014).

#### 4.6 FISH

La hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) específicos para rARN es una herramienta esencial para la identificación no dependiente de cultivo de microorganismos en muestras ambientales y clínicas. Consiste en la introducción de oligonucleótidos que se hibridan con el rARN y dado que los oligonucleótidos son específicos y adicionados con un fluorocromo, las bacterias o microorganismos en los cuales ocurre la hibridación pueden ser enumerados usando un microscopio dotado con los filtros específicos.

Método DVC-FISH (Sigla)

Consiste en la combinación de las técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH), y la técnica recuento directo de células viables (DVC), esta última permite la detección de células bacterianas en estado viable (Mezule, 2013). Las células viables se diferencian porque el antibiótico, ácido Nalidixico inhibe la generación del septum de división, lo cual hace que las bacterias se dupliquen sin separarse generando la imagen de una única célula elongada (Baudart y Colaboradores en el 2005)

el método DVC-FISH permite cuantificar bacterias "viables no cultivables" presentes en aguas que están en proceso de potabilización. La técnica DVC-FISH para conteo de bacterias viables no cultivables, presenta una especificidad (E0) del 99% y Sensibilidad (S0) del 99% (Legues et al., 2002)

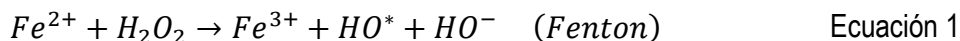
#### 4.7 Procesos Avanzados de Oxidación - PAOX

Los Procesos Avanzados de Oxidación o Advanced Oxidation Processes o AOPs, se basan en la producción de especies altamente oxidantes que permiten la destrucción de compuestos químicos bio-recalcitrantes y sustancias tóxicas o lograr la desinfección. Dentro de las ROS se incluyen: el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) y oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Estos radicales son capaces de oxidar compuestos orgánicos, principalmente por abstracción de hidrógeno, por adición electrofílica a dobles enlaces generando radicales orgánicos libres ( $\text{R}\cdot$ ) que reaccionan a su vez con moléculas

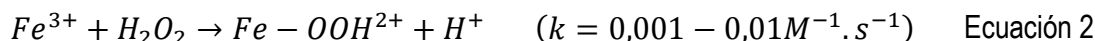
de oxígeno para formar peroxiradicales, e inician una serie de reacciones que producen estrés oxidativo en los microorganismos y degradación de moléculas orgánicas, incluso hasta la completa mineralización de ciertos contaminantes (Herrmann, 2005). La Organización Mundial de la Salud reconoce que los procesos basados en la generación de radicales hidroxilo permite la destrucción de compuestos que son difíciles de tratar por otros métodos, debido a la fuerte actividad oxidante no discriminatoria de estas especies oxidantes; en estos procesos se logra la reacción con una amplia gama de compuestos orgánicos y se reconoce el uso de peróxido de hidrógeno y ozono a una dosis de 0.4 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 ppm de O<sub>3</sub> con adición de bicarbonato (WHO, 2006).

#### 4.8 Reacción foto-Fenton

En la reacción Fenton, la generación de radicales hidroxilo se logra por la descomposición del peróxido de hidrógeno por medio de la oxidación de iones ferrosos disueltos, como se puede observar en la Ecuación 1 (Micó *et al.*, 2013).



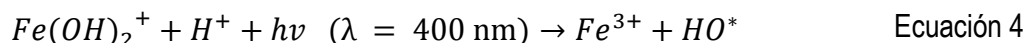
El ion Férrico (Fe<sup>3+</sup>) puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno mediante la Ecuación 2. (Ikehata y Gamal, 2006).



El ion hierro (II) hidroperoxil (Fe-OOH<sup>2+</sup>) se descompone en radical hidroperoxil y el ion ferroso, como se puede ver en la Ecuación 3. En la reacción inducida por la luz de iones ferrosos y/o férricos con peróxido de hidrógeno, se genera especies reactivas del oxígeno, tales como superóxido protonado (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>) y <sup>•</sup>OH radical hidroxilo, este es un método prometedor para inactivar microorganismos transmitidos por el agua (Rengifo, 2013).

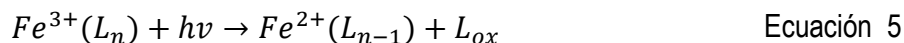


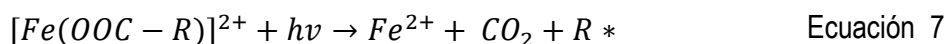
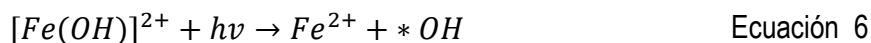
En presencia de la luz UV, se presenta foto-reducción del Fe<sup>3+</sup>, recuperando Fe<sup>2+</sup> y contribuyendo a una vía adicional que conduce a una mayor generación de radicales libres con respecto a la reacción Fenton (Ecuación ) (Micó *et al.*, 2013).



La regeneración del ion ferroso y la generación adicional de OH<sup>\*</sup> durante la fotólisis, facilita la degradación de compuestos orgánicos (Ikehata y Gamal, 2006).

Bajo iluminación, los complejos hidro-férricos u órgano-férricos en solución, pueden absorber protones y generar complejos de transferencia de carga metal a ligando, reacción en la cual el Fe<sup>+2</sup> genera OH<sup>\*</sup>, según se presenta en la Ecuación 5, Ecuación 6, Ecuación 7. (Ndounla *et al.*, 2013)





Se ha postulado frecuentemente un pH óptimo de 2,8 unidades, para el tratamiento foto-Fenton, porque a este pH el hierro aún no precipita y la especie de hierro predominante en la solución es  $[Fe(OH)]^{2+}$ , el complejo más fotoactivo.

El uso de esta tecnología tiene como ventaja que el hierro es abundante y no tóxico, el peróxido de hidrógeno es fácil de manejar y ambientalmente benigno, no se forman compuestos clorados y no existen limitaciones de transferencia de masa por tratarse de un sistema homogéneo. Presenta como inconveniente el requerimiento de pH ácidos para evitar la precipitación del hierro. Sin embargo, el empleo de otros compuestos como el ferrioxalato ha permitido llevar a cabo esta reacción en condiciones cercanas a la neutralidad (Cho *et al.*, 2004).

#### 4.9 Hierro como catalizador en el proceso Fenton

La reactividad química del hierro, como catalizador en el proceso fenton para descomponer el peróxido en  $OH^*$ , es estrictamente dependiente del pH, asociada a la especiación de  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y los hidróxidos férricos, lo cual determina el tipo, la disponibilidad y requerimientos prácticos para cada uno de los procesos avanzados de oxidación basados en fenton (Bokare y Choi., 2014), como se observa en la Figura 1.

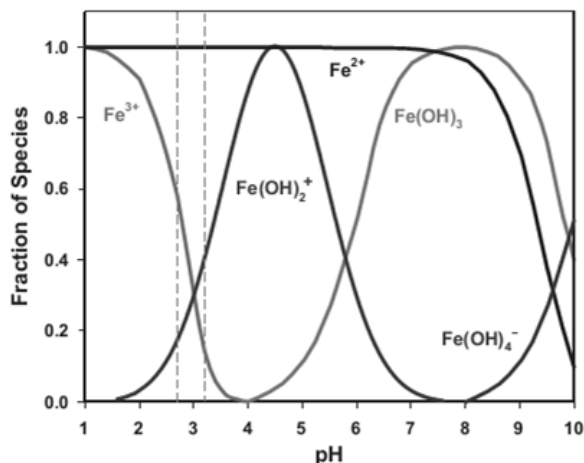


Figura 1. Especies de hierro en solución acuosa como una función del pH. Las líneas punteadas indican el rango de pH óptimo de trabajo (2,8-3,2 unidades) para la reacción fenton (tomado de Bokare y Choi., 2014)

Aunque el  $Fe^{+2}$  permanece en forma disuelta incluso a pH neutro, el  $Fe^{+3}$  desaparece a un pH mayor o igual a 4 y forma lodo de hidróxido férrico. Estos compuestos son foto activos bajo irradiación UV o de luz solar, permitiendo la regeneración de  $Fe^{+2}$ , pese a esto la existencia de complejos no foto activos en los lodos de hidróxido férrico, cuando dichos lodos se encuentran a altas concentraciones, reducen la penetración de luz, limitando las aplicaciones del proceso a gran escala. Se establece

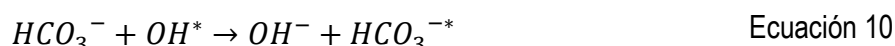
entonces que a un pH cercano a 3, las tres especies activas de Fenton:  $Fe^{+2}$  (Fenton clásico),  $Fe^{+3}$  y  $[Fe^{III} (OH)]^{2+}$  (foto Fenton) pueden coexistir (Bokare y Choi., 2014).

#### 4.10 Efecto de los iones en el proceso foto-Fenton

Existen iones que según sus características pueden limitar o mejorar el proceso de oxidación mediante foto-Fenton. Por ejemplo, los iones carbonato y bicarbonato, así como la materia orgánica natural, son eliminadores del radical hidroxilo (Glaze et al., 1995; Crittenden et al., 1999, citados por Micó et al., 2013), disminuyendo la velocidad de degradación de sustancias orgánicas.

Devi et al., (2011) explican el efecto eliminador del radical hidroxilo para los aniones nitratos, carbonatos y bicarbonatos mediante la Ecuación 8

Ecuación 8 a Ecuación 10 respectivamente.

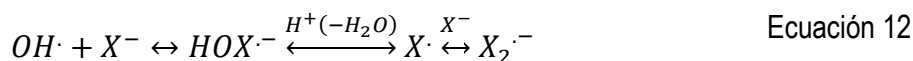


Se ha demostrado que los fosfatos, sulfatos y cloruros tienen un rol inhibitor (Soler et al., 2009; Ikehata y Gamal El-Din, 2006). El efecto inhibitor del cloruro es atribuido a la disminución de la eficiencia en la formación del radical hidroxil, debido a la generación de  $Cl_2^{\cdot-}$  en lugar del más reactivo  $OH^{\cdot}$ , lo cual puede ocurrir por fotólisis del  $FeCl^{2+}$  (Ecuación 11) (Soler et al., 2009).



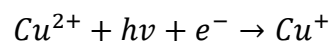
Mientras la inhibición relacionada con los fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) se atribuye a la capacidad de remover los iones de hierro, a través de la formación de fosfato de hierro no soluble (Soler et al., 2009).

La inhibición de las reacciones Fenton por  $Cl^-$  y  $Br^-$  es debido a el consumo de los radicales  $HO^{\cdot}$ , ya que estos iones son ligandos relativamente débiles de Fe (III) (Ecuación 19) (Pignatello et al., 2007).



Por otro lado, la presencia simultánea de cobre puede mejorar el proceso (ver Ecuación 13 y Ecuación 14) (Soler et al., 2009).





Ecuación 14

El Manganeseo posee un efecto catalítico en la presencia de  $H_2O_2$ , alcanzando una eficiencia catalítica alta inclusive a pH superiores a 6,0 unidades (Tizaoui *et al.*, 2010). Se reporta además que en condiciones aerobias neutrales, las especies tetravalentes de Mn pueden ser fácilmente reducidas a  $Mn^{+2}$  a través de un proceso químico de óxido-reducción, convirtiendo al  $MnO_2$  en un potente oxidante para la transformación directa de toxinas acuáticas, esta fácil interconversión puede permitir la activación de  $H_2O_2$  a través de un proceso basado en Fenton, catalizado por el Mn, mostrando un óptimo comportamiento en condiciones cercanas a la neutralidad, ya que su reactividad oxidativa no cambia significativamente en el rango de pH 3,5-7,0 unidades (Bokare y Choi., 2014).

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Ubicación

Este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental de la Universidad del Valle, sede Meléndez (Santiago de Cali, Colombia).

### 5.2 Muestras

La selección de la muestras a tratar se determinó según estudios previos realizados por Mejía (2014), donde se evaluó el agua subterránea perteneciente al corregimiento “El Tiple”, lo que permitió establecer la caracterización físico-químicas y microbiológica de esta fuente de agua. Se usó una muestra de un pozo localizado en las coordenadas 3°21'03.38" N, 76°26'24.51" S. El agua subterránea se almacenó a una temperatura entre (2 – 4°C) en botellas de vidrio color ambar. Para los ensayos con agua Mili-Q esta fue obtenida mediante el equipo Barnstead Easypure II.

### 5.3 Reactores

Para los ensayos se usó un simulador de radiación solar Suntest Hanau con lámpara de Xenón de 1500 W, intensidad de radiación de 300W/m<sup>2</sup>, cuyo espectro es igual al espectro solar entre 400 – 800 nm. Se usaron reactores con volumen total de 100 mL y un volumen de agua subterránea de 80 mL. Los reactores permanecieron en agitación a 230 rpm y una temperatura entre (36 – 38°C). Los reactores se inocularon con el microorganismo *Echerichia coli* k12 a una concentración 10<sup>-6</sup>-10<sup>-7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> la concentración de bacterias se determinó a partir de la técnica McFarland (Díaz et al., 2000).

### 5.4 Determinación del tiempo mínimo de tratamiento

Para la evaluación del efecto del tiempo sobre la viabilidad y cultivabilidad en el tratamiento foto Fenton a pH neutro, se realizaron ensayos por triplicado. Las concentraciones de Peróxido 10 mgL<sup>-1</sup>, pH natural cercano a la neutralidad (7,10) y hierro natural del agua subterránea (0,3 mg.L<sup>-1</sup>) se identificaron de acuerdo a la literatura. Con una duración total de 8 horas, tomando muestras para conteo por recuento estándar en placa (RCP) y viabilidad por (DVC-FISH). se siguieron controles de tratamiento, Fenton a pH neutro (7,1 unidades), Fotólisis y Oscuridad sin adición de peróxido (Blanco).

Se realizó seguimiento de células viables de *E. coli* K12, y los parámetros físico-químicos peróxido, Potencial de Oxidación Reducción (ORP), Oxígeno disuelto, temperatura, conductividad, Fe<sup>+2</sup>, y pH (AWWA, APHA y WEF; 2005). A partir de lo anterior, se determinó la cinética de desinfección del microorganismo *E. Coli* K12.



## 5.5 Evaluación del efecto de la concentración de hierro, concentración de peróxido y pH en el tratamiento de desinfección vía foto-Fenton en agua Subterránea

Se exploraron condiciones en peróxido, hierro y pH para el tratamiento foto Fenton, teniendo en cuenta el valor máximo y mínimo de pH, además la concentración promedio y máxima de Hierro total, obtenidos en la caracterización del agua subterránea de estudio (Mejía, 2014). La Tabla 2 muestra los factores experimentales y sus niveles usados en los ensayos de desinfección.

Tabla 2. factores y niveles experimentales usados en los ensayos de desinfección

Factor	Nivel
Peróxido	10 mg.L <sup>-1</sup> y 4 mg.L <sup>-1</sup>
Hierro	0,3 mg.L <sup>-1</sup> y 0,9 mg.L <sup>-1</sup>
Irradiación	Con y Sin
pH	6,78 , 7,65 y 2,8

Variables de respuesta : desinfección de la cepa *E. coli* K12

Tiempos de medición de la variable de respuesta: 0, 45, 90, 180, 270 y 360 min de Tratamiento

Repeticiones: 3

Diseño experimental factorial completamente al azar 2<sup>3</sup>

En la tabla 3 se muestra la matriz de experimentos del diseño factorial.

Tabla 3. Matriz de experimentos del diseño factorial 2<sup>3</sup> para estudiar el efecto de los factores pH, hierro total y peróxido (el signo (-) hace referencia a la mínima concentración del factor y el signo (+) representa la máxima concentración evaluada)

N°	pH	(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	(Fe total) mgL <sup>-1</sup>
1	-	+	+
2	-	-	-
3	+	+	-
4	-	+	-
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	+
8	-	-	+

## 5.6 Comparación de la desinfección con foto Fenton y Cloración de aguas subterráneas

### 5.6.1 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa *E. coli* K12 mediante foto-Fenton a pH neutro en agua subterránea

Se determinó el comportamiento cinética de desinfección de la cepa *E. coli* K12. La Tabla 4 muestra los factores experimentales y sus niveles usados en los ensayos de desinfección.

Tabla 4. factores y niveles experimentales usados en los ensayos de desinfección

Factor	Nivel
Peróxido	10 mg.L <sup>-1</sup>
Hierro	0,3 mg.L <sup>-1</sup>
Irradiación	Con y Sin
pH	6,78

Variables de respuesta : desinfección de la cepa *E. coli* K12

Tiempos de medición de la variable de respuesta: 0, 45, 90, 120, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 y 420 min de Tratamiento

Repeticiones: 3

### 5.6.2 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa *E. coli* K12 mediante Cloración a pH neutro en agua subterránea

Se realizó la demanda de cloro, evaluando concentraciones de cloro desde 0,2 hasta 10,0 mg Cl<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> que fueron adicionadas a partir de la solución estándar de cloro. Después de un tiempo de contacto de una hora, se tomaron muestras en las botellas y se determinó el cloro libre y combinado. La demanda de cloro fue la diferencia del cloro adicionado y el cloro libre medible. (Ver Anexo 1). La Tabla 5 muestra los factores experimentales y sus niveles usados en los ensayos de desinfección.

Tabla 5. factores y niveles experimentales usados en los ensayos de desinfección

Factor	Nivel
Cl <sub>2</sub>	6,0 mg.L <sup>-1</sup> y 6,5 mg.L <sup>-1</sup>
pH	6,78 y 7,65

Variables de respuesta : desinfección de la cepa *E. coli* K12

Tiempos de medición de la variable de respuesta: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 45 min de Tratamiento

Repeticiones: 3

Diseño experimental factorial completamente al azar 2<sup>2</sup>

En la tabla 6 se muestra la matriz de experimentos del diseño factorial.

Tabla 6. Matriz de experimentos del diseño factorial  $2^2$  para estudiar el efecto de los factores pH y  $\text{CaClO}_2$  (el signo (-) hace referencia a la mínima concentración del factor y el signo (+) representa la máxima concentración evaluada)

Nº	pH	( $\text{CaClO}_2$ )
1	+	-
2	-	-
3	-	+
4	+	+

## 5.7 Determinación del efecto de los iones presentes en el agua subterránea en la desinfección de *E. coli* K12 vía foto-Fenton

### 5.7.1 Efecto individual de iones

Con el fin de determinar cuáles de los iones presentes tendrían influencia (positiva o negativa) en el tratamiento foto-Fenton para la desinfección se evaluaron de forma independiente los iones ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Se realizó en agua Mili-Q adicionando los niveles máximos de cada ion a su concentración natural, obtenidas en un estudio previo (Mejía, 2014). En la Tabla 7 se presentan los factores y sus niveles usados en la desinfección, además de la solución utilizada para cada ion. Las condiciones de pH, concentración de Peróxido y concentración de hierro están especificadas en la tabla 4.

Tabla 7. factores y niveles experimentales usados en los ensayos de efecto de iones en la desinfección

Factor	Nivel	Solución
Fluoruro ( $\text{F}^-$ )	1,2 mg.L <sup>-1</sup>	NaF
Cloruro ( $\text{Cl}^-$ )	193 mg.L <sup>-1</sup>	NaCl
Manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ )	1,53 mg.L <sup>-1</sup>	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	9,35 mg.L <sup>-1</sup>	$\text{Na}_2\text{SO}_4$
Fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	1,65 mg.L <sup>-1</sup>	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$
Bicarbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ )	745,4 mg.L <sup>-1</sup>	$\text{NaHCO}_3$

Variables de respuesta : desinfección de la cepa *E. coli* K12

Tiempos de medición de la variable de respuesta: 0, 45, 90, 120, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 min de Tratamiento

Repeticiones: 2

### 5.7.2 Ensayo de Iones combinados

Se realizaron ensayos en agua Mili-Q, utilizando los niveles máximos y mínimos para cada ion a su concentración natural seleccionados apartir del ensayo anterior, determinadas en un estudio previo, como se observa en la Tabla 8. Las condiciones de pH, concentración de Peróxido y concentración de hierro están especificadas en la tabla 4.

Tabla 8. Factores y niveles experimentales usados en los ensayos de efecto de iones combinados en la desinfección

Factor	Nivel
Irradiación	Con y Sin
Fluoruro ( $F^-$ )	0,153 y 1,2 mg.L <sup>-1</sup>
Bicarbonato ( $HCO_3^-$ )	217 y 745,4 mg.L <sup>-1</sup>
Fosfato ( $PO_4^{=}$ )	0,06 y 1,65 mg.L <sup>-1</sup>
Sulfatos ( $SO_4^{=}$ )	13,2 y 935 mg.L <sup>-1</sup>

Variables de respuesta : desinfección de la cepa *E. coli* K12

Tiempos de medición de la variable de respuesta: 90, 180, 270, 360 y 420 min de Tratamiento

Repeticiones: 2

Diseño experimental factorial completamente al azar 2<sup>4</sup>

En la tabla 9 se muestra la matriz de experimentos del diseño factorial.

Tabla 9. Matriz de experimentos del diseño factorial completo 2<sup>4</sup> para estudiar el efecto de los iones (el signo (-) hace referencia a la mínima concentración del ion y el signo (+) representa la máxima concentración evaluada)

R°	(F <sup>-</sup> )	(SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> )	(HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	(PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> )
1	-	+	-	+
2	-	-	+	-
3	+	+	+	-
4	+	-	-	-
5	-	+	+	-
6	+	-	+	+
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+
9	+	+	-	-
10	+	-	-	+
11	-	-	-	-
12	+	-	+	-
13	+	+	+	+
14	-	+	-	-
15	+	+	-	+
16	-	+	+	+

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Evaluación del efecto del tiempo sobre la viabilidad y cultivabilidad en el tratamiento foto Fenton a pH neutro

#### 6.1.1 Seguimiento del recuento de células viables y cultivables

En la Figura 2 se presenta el seguimiento a la población celular de *E. coli* K12 en el proceso foto Fenton, Fotólisis, Fenton a pH cercano a la neutralidad (7,1 unidades) para RCP y DVC-FISH.

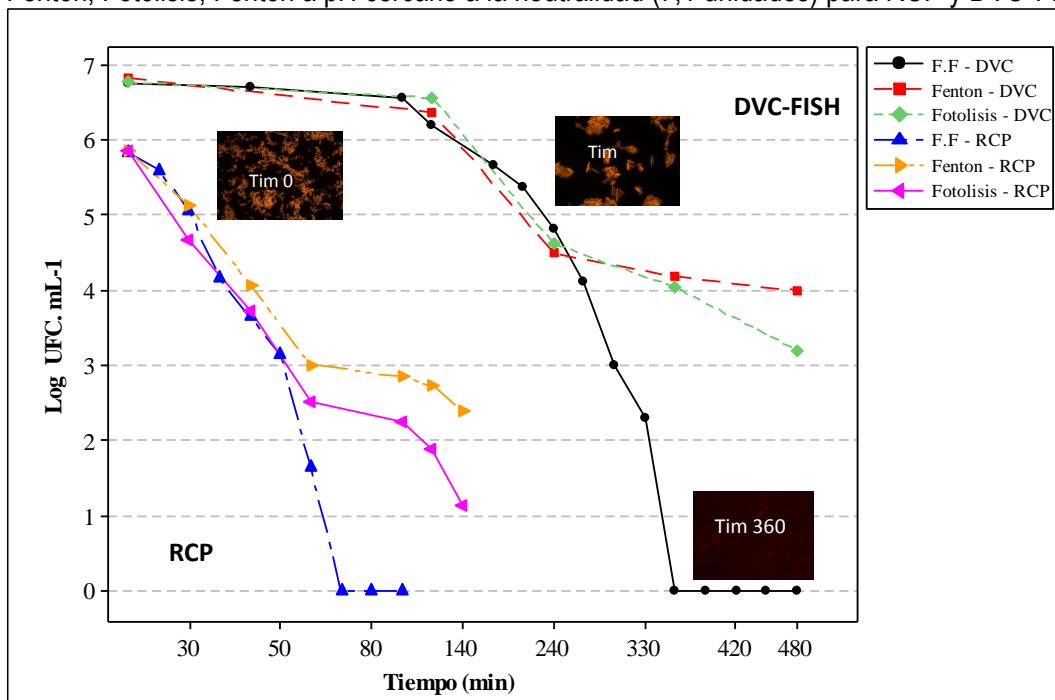


Figura 2. Seguimiento de la cultivabilidad y viabilidad a la población celular de *E. coli* K12 durante el ensayo foto Fenton a pH 7,1 unidades en agua subterránea (F.F pH 7,1 – RCP y DVC) y controles Blanco (0,3mgL<sup>-1</sup> Fe total/Oscuridad), Fenton pH 7,1 unidades (Fenton pH 7,1 – RCP y DVC) y Fotólisis (0,3 mgL<sup>-1</sup> Fe total/Irradiación pH 7,1 – RCP y DVC)

En la figura 2, se observa, que mediante DVC-FISH la desinfección en el control Fenton a pH 7,1 unidades al finalizar el tratamiento de 8 horas permanece con un recuento celular cercano a 4 logs. El control Fotólisis a pH 7,1 unidades al finalizar el tratamiento reportó valores de recuento celular iguales a 3 logs, por el método DVC-FISH.

Se observa que para el tiempo de tratamiento (360 min) se alcanzan recuentos celulares iguales a cero (con recuento total de los campos visuales efectivos). Las células de *E. coli* K 12 al inicio del experimento (sin irradiación) reportó un tamaño celular promedio de 1,5  $\mu$ m para el 99% de células de *E. coli* K 12 evaluadas antes de la incubación, mientras que más de 98% alcanzaron valores

entre (2 - 3,5  $\mu\text{m}$ ) después de 18 h en el medio DVC. Las células de *E. coli* K 12 elongadas pueden ser fácilmente reconocidas por la sonda ES-445.

## 6.2 Evaluación del efecto de la concentración de hierro, concentración de peróxido y pH en el tratamiento de desinfección vía foto-Fenton en agua Subterránea

Los resultados obtenidos durante la evaluación del efecto de los factores hierro, peróxido y pH, según las combinaciones establecidas en el diseño experimental factorial (ver Anexo 2), se presentan en la Figura 3. La combinación de iones reportada como R1 a R8 se estableció según la tabla 3.

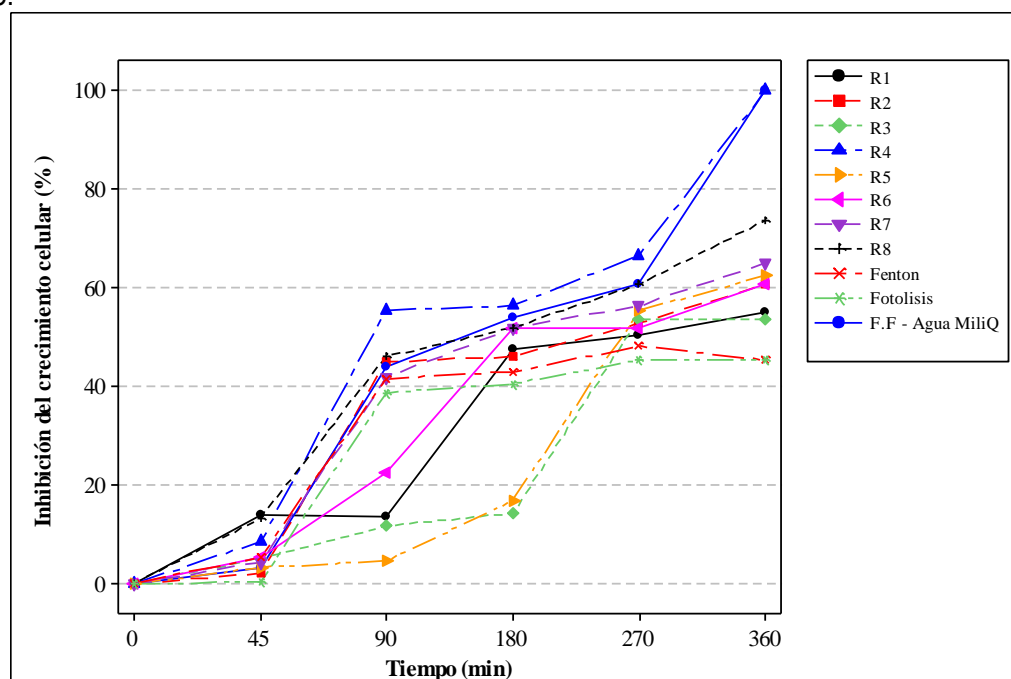


Figura 3. Porcentaje de inhibición de la cepa *E. coli* K12 en ensayo de factores peróxido, hierro y pH cercano a la neutralidad. Los factores pH (el signo (-): 6,78, el signo (+): 7,65); hierro total (el signo (-): 0,3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , el signo (+): 0,9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y peróxido (el signo (-): 4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , el signo (+): 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La combinación **R1**: pH (-),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (+); **R2**: pH (-),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (-); **R3**: pH (+),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (-); **R4**: pH (-),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (-); **R5**: pH (+),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (-); **R6**: pH (+),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (+); **R7**: pH (+),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (+),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (+); **R8**: pH (-),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (-),  $\text{Fe}_{\text{total}}$  (+). Controles Fotólisis (irradiación, hierro total 0,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y pH 6,78), Fenton (oscuridad, hierro total 0,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,78 y peróxido 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y foto-Fenton en agua Mili-Q (irradiación, hierro total 0,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,78 y peróxido 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

A partir de la Figura 3, se observa que se alcanza una mayor eficiencia de inhibición de la cepa *E. coli* K12 en el tratamiento F.F - R4 (pH 6,78 unidades,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y hierro total 0,3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mientras el menor porcentaje de inhibición celular se obtuvo con la combinación de factores en el tratamiento F.F - R3 (pH 7,65 unidades,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y Hierro total 0,3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 6.3 Comparación de la desinfección con foto Fenton y Cloro de aguas subterráneas

#### 6.3.1 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa *E. coli* K12 mediante foto-Fenton a pH neutro en agua subterránea, utilizando los valores de pH, hierro y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que fueron favorables del ensayo de factores

La pendiente de la recta obtenida representa el valor de la constante K, el orden de la reacción es dos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.

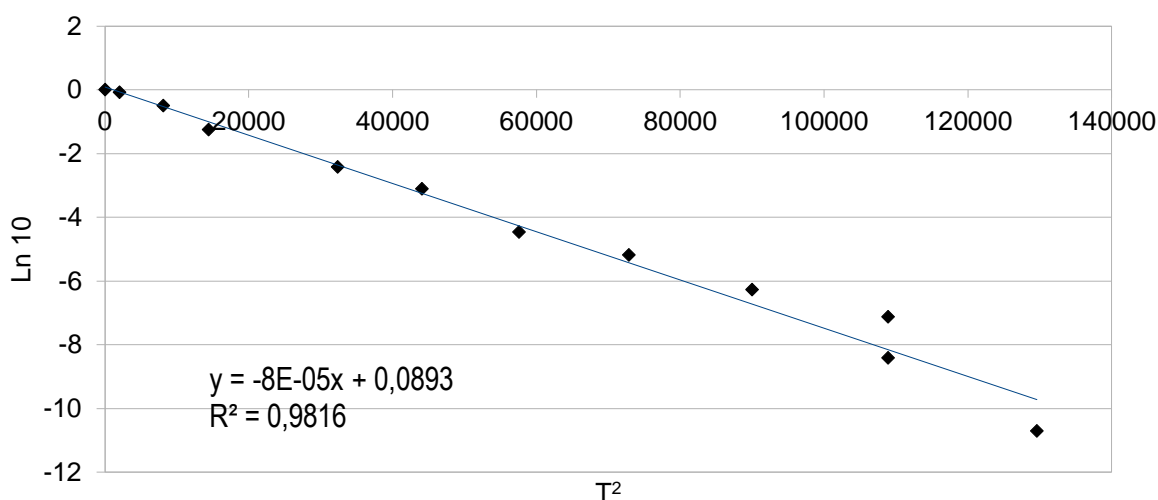


Figura 4. Cinética desinfección de *E. coli* K12 mediante foto Fenton a pH neutro en agua subterránea

Mediante la Figura 4 se observa que la desinfección de *E. coli* K12 a través de foto Fenton a pH neutro en agua subterránea cumple con una cinética de segundo orden, ya que el coeficiente  $r^2$  es 0,98. La pendiente de la recta obtenida representa el valor de la constante K.

### 8 Evaluación del efecto de la concentración de CaClO<sub>2</sub>, y pH cercano a la neutralidad en la desinfección de la cepa *E. coli* K12 en agua subterránea mediante Cloración

Los resultados obtenidos de la desinfección de *E. coli* K12 durante la evaluación del efecto de los factores, según las combinaciones establecidas en el diseño experimental, se presentan en la Figura 5. La combinación e identificación de factores R1 a R4 se presentó en la tabla 6 y en el Anexo 3.

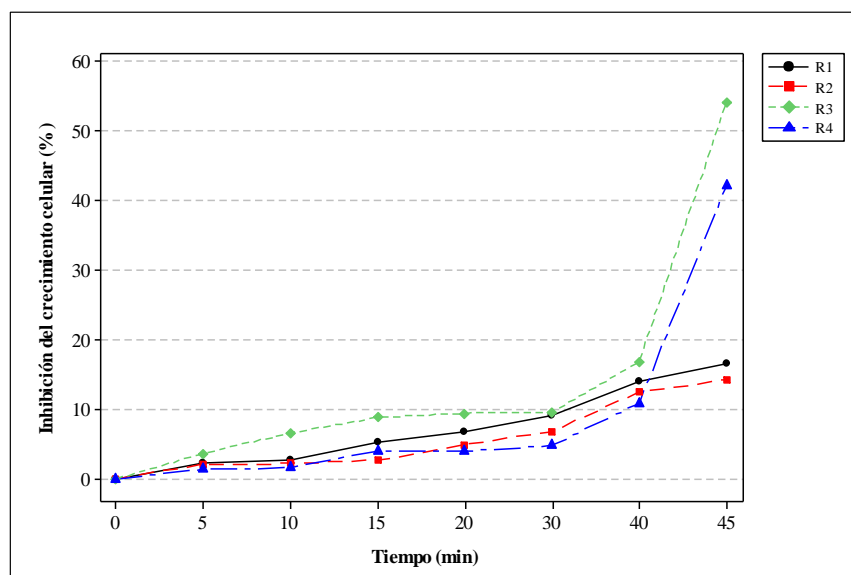


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento la cepa *E. coli* K12 en ensayo de factores cloro y pH cercano a la neutralidad en el tratamiento cloración. Los factores pH (el signo (-): 6,78, el signo (+): 7,65); cloro ( $\text{Cl}_2$ ) (el signo (-):  $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , el signo (+):  $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). La combinación **R1**: pH (+),  $\text{Cl}_2$  (-); **R2**: pH (-),  $\text{Cl}_2$  (-); **R3**: pH (-),  $\text{Cl}_2$  (+); **R4**: pH (+),  $\text{Cl}_2$  (+).

A partir de la Figura 5, se observa que se alcanza la mayor eficiencia de inhibición de la cepa *E. coli* K12 en el tratamiento R-3 (pH 6,78 unidades, y cloro  $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), siendo este valor igual a 54,14%, mientras el menor porcentaje de inhibición celular se obtuvo con la combinación de factores en el tratamiento F.F – R2 (pH 6,78 unidades, y cloro  $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) alcanzando un valor de 14,25%.

### 8.1.1 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa *E. coli* K12 mediante Cloración a pH neutro en agua subterránea

La pendiente de la recta obtenida representa el valor de la constante K, el orden de la reacción es dos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.

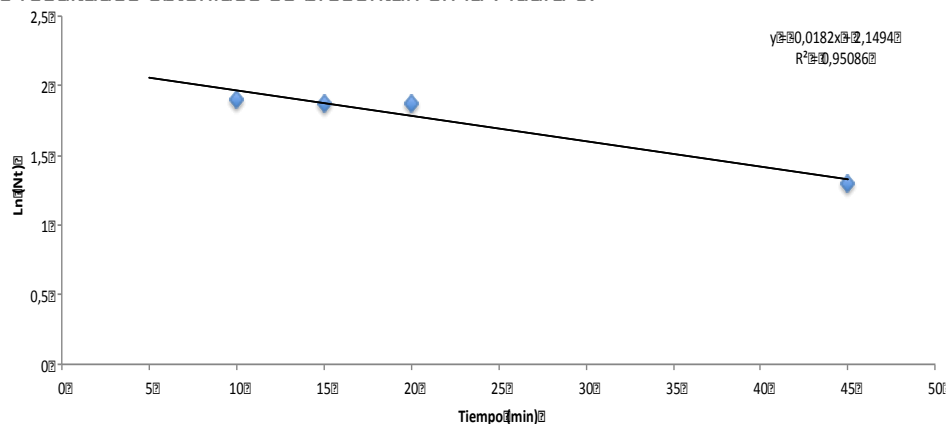


Figura 6. Cinética desinfección de *E. coli* K12 mediante cloración a pH neutro en agua subterránea



En la Figura 6 se observa que la desinfección de *E. coli* K12 a través de foto Fenton a pH neutro en agua subterránea cumple con el modelo de Chick, ya que el coeficiente  $r^2$  es 0,95. La pendiente de la recta obtenida representa el valor de la constante K.

**8.1.2 Evaluación de las eficiencias de desinfección para los procesos foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad y cloración con hipoclorito de calcio (CaClO<sub>2</sub>) en fuentes de aguas subterránea**

Con base en la Tabla 10, se realizó una comparación del tiempo de contacto teórico asociado a una concentración de la cepa *E. coli* K12 entre (10<sup>6</sup> -10<sup>7</sup>) UFC.mL<sup>-1</sup>, para alcanzar la desinfección en cada tratamiento.

Tabla 10. Tiempo teórico de desinfección completa para los tratamientos foto-Fenton y Cloración en agua subterránea.

	Tratamiento	
	foto-Fenton	cloración
t ½ (min)	135	52,45
t 99% (min)	350	135

Se observa al determinar la cinética para los tratamientos foto-Fenton y Cloración, el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) con valores 135 min y 52,45 minutos respectivamente.

**8.2 Determinación del efecto de los iones presentes en el agua subterránea en la desinfección de *E. coli* K12 vía foto-Fenton**

**8.2.1 Efecto individual de iones**

La Figura 7 muestra el seguimiento de la población celular bajo el efecto individual de cada ion evaluado (ver datos en Anexo 4).

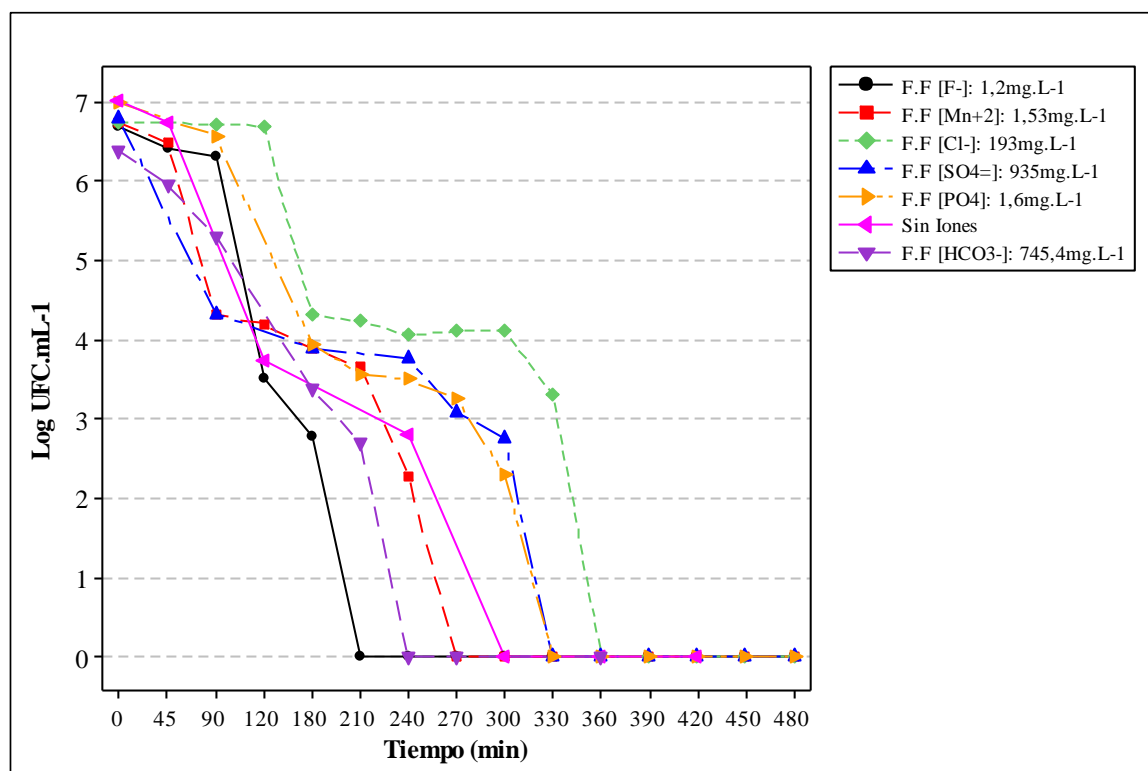


Figura 7. Decaimiento de la población celular de *E. coli* K12 en ensayo de iones (con concentración de hierro total igual a  $0,3\text{mgL}^{-1}$ , peróxido de  $10\text{mgL}^{-1}$  y pH igual a 6,98 unidades)

En la Figura 7 el decaimiento celular de *E. coli* en agua Mili-Q (sin iones) se hace cero en el minuto 300. También se observa que el comportamiento de decaimiento celular de *E. coli* K12 para los iones Fluoruro y Manganeseo, llega a cero células viables en los tiempos 210 y 270 minutos respectivamente.

### 8.2.2 Ensayo de Iones combinados

Se presenta en la Figura 8, el seguimiento a la desinfección en agua Mili-Q con la presencia de los iones  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , además de los controles sin adición de iones en agua mili-Q Fenton pH neutro, Fotólisis  $h\nu / \text{Fe}$  (con concentración de hierro), foto Fenton a pH cercano a neutralidad  $\text{H}_2\text{O}_2 / h\nu / \text{Fe}$  (FF pH 7,01) y Foto fenton a pH 2,8 (F.F pH 2,8). Las concentraciones y combinaciones de los iones se presentó en la tabla 9 y Anexo 5.

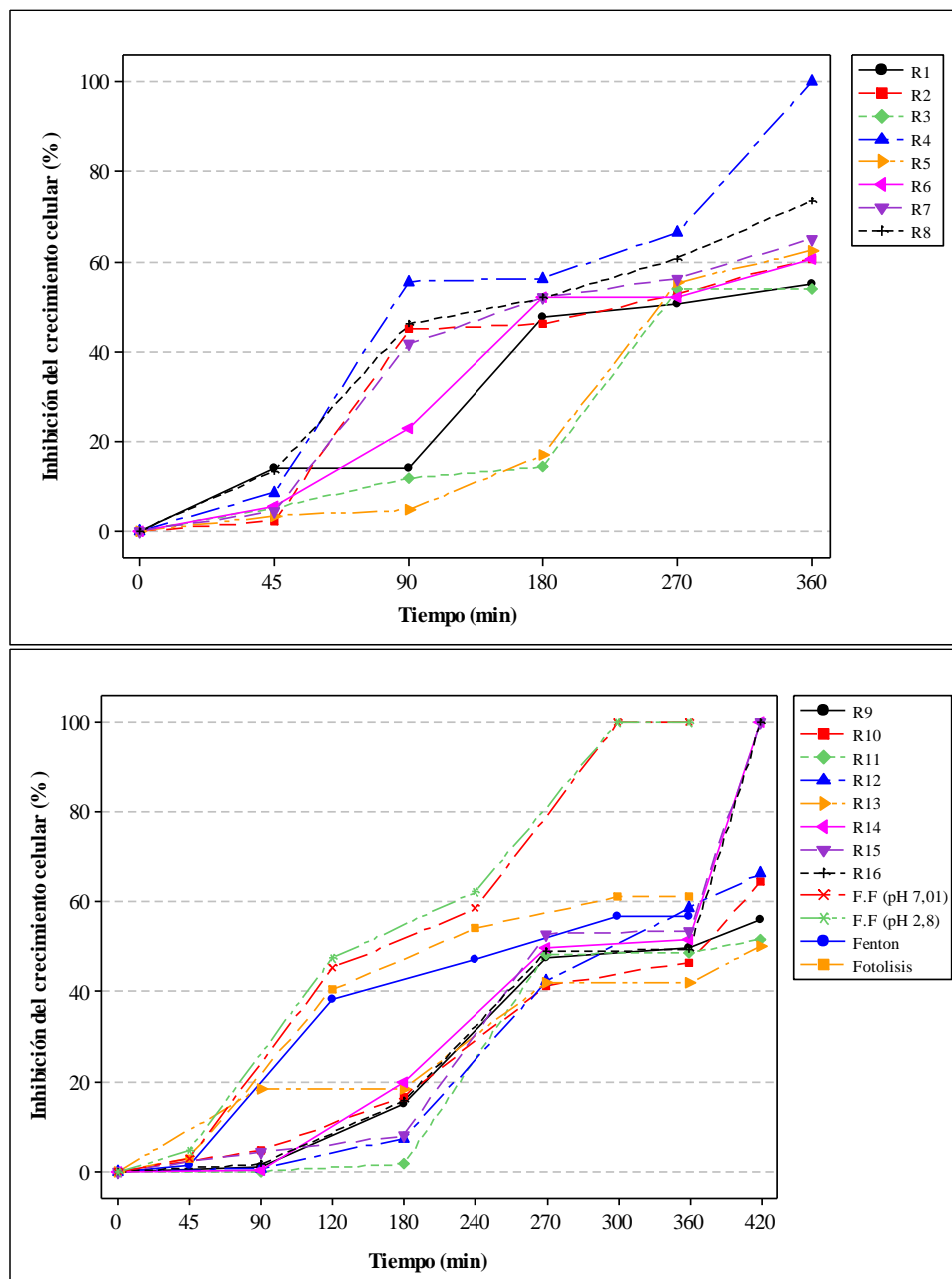


Figura 8. Seguimiento del porcentaje de inhibición del crecimiento celular en ensayo de combinación de iones. Los factores  $F^-$  (el signo (-): 0,153 mg.L<sup>-1</sup>, el signo (+): 1,2 mg.L<sup>-1</sup>);  $HCO_3^-$  (el signo (-): 217 mg.L<sup>-1</sup>, el signo (+): 745,4 mg.L<sup>-1</sup>);  $PO_4^{=}$  (el signo (-): 0,06 mg.L<sup>-1</sup>, el signo (+): 1,65 mg.L<sup>-1</sup>);  $SO_4^{=}$  (el signo (-): 13,2 mg.L<sup>-1</sup>, el signo (+): 935 mg.L<sup>-1</sup>). La combinación **R1**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (+); **R2**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (-); **R3**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (-); **R4**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (-); **R5**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (-); **R6**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (+); **R7**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (+); **R8**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (+); **R9**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (-); **R10**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (+); **R11**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (-); **R12**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (-),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (-); **R13**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (+); **R14**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (-); **R15**:  $F^-$  (+),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (-),  $PO_4^{=}$  (+); **R16**:  $F^-$  (-),  $SO_4^{=}$  (+),  $HCO_3^-$  (+),  $PO_4^{=}$  (+). foto-Fenton sin iones a pH 7,01 un., Fenton (pH 7,01 un.), Fotólisis sin iones y foto Fenton sin iones pH 2,8 unidades

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Evaluación del efecto del tiempo sobre la viabilidad y cultivabilidad en el tratamiento foto Fenton a pH neutro

#### 8.1.1 Seguimiento del recuento de células viables y cultivables

En el tratamiento foto-Fenton con pH cercano a la neutralidad el recuento llevado a cabo con UFC mL<sup>-1</sup> (cultivabilidad) alcanzó el cero en 70 min, mientras que de las células viables se observaron hasta el tiempo de 360 min. Esto evidencia que el 99% de las células bacterianas están vivas a pesar de no ser cultivables. Los resultados de cultivabilidad obtenidos en nuestros experimentos son comparables con otros publicados usando la misma cepa de *E. coli* y foto-Fenton (Ruales-Lonfat et al., Ndounla et al, 2013). A partir de nuestra revisión no pudimos encontrar trabajos en otros laboratorios en los cuales se haga medición de viabilidad con foto-Fenton y *E. coli*. Sin embargo el conflicto entre los resultados de viabilidad vs cultivabilidad ha sido reportado para otras formas de desinfección y otros microorganismos como es el caso de los trabajos reportados por Rengifo et al., 2013 en el que se evaluó la viabilidad de las cepas *E. coli* y *Salmonella* en tratamiento foto-Fenton a pH 5.

Los mecanismos que posiblemente están involucrados en la inhibición de las células están relacionados con, la formación o la penetración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe<sup>2+</sup> en el citoplasma por los sistemas (fotólisis y fenton), además de los foto-sensibilizadores endógenos que pueden conducir a estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton intracelular, generando radicales •OH altamente tóxico que pueden atacar directamente el ADN, a través de la dimerización de pirimidina, genera la inhibición del crecimiento celular (Ruales-Lonfat et al., 2014). El ion férrico Fe<sup>3+</sup> puede ser adsorbido o absorbido por las proteínas de la membrana bacteriana, lo que conduce a la formación de Fe<sup>3+</sup> - bacterias excíplejos – (complejo excitado electrónicamente). La fotosensibilización de estas formas por parte de UVA y la luz visible podría resultar en la oxidación directa de la membrana, la iniciación de las cadenas de peroxidación de lípidos, y la generación de Fe<sup>2+</sup> y •OH (Wu Feng, 2000).

La generación de radicales •OH y otros ROS se forman en la mayor parte de la solución mediante un proceso homogéneo a través de la contribución de las siguientes rutas (A) extracelulares disueltos Fe<sup>2+</sup> / Fe<sup>3+</sup> reacción homogénea de foto-Fenton (ver Ecuación 1 y 3) generan radicales OH•, (B) a pH casi neutro, Fe<sup>2+</sup> se oxida y se precipita como hidróxido férrico. Sideróforos secretados por las bacterias aumentan la disolución de hidróxido férrico por la luz inducida. Además, los subproductos generados a partir de la desinfección bacteriana pueden ser ligandos polidentados que forman complejos con los iones férricos (Fe<sup>3+</sup> subproductos), lo que permite su solubilización. La foto-reducción de estos complejos bajo radiación UVA y visible, produce •OH y la regeneran de Fe<sup>2+</sup> a través de la transferencia de carga-ligando a metal (LMCT) (Wu Feng, 2000). (C) El radical formado por la fotosensibilización de Fe<sup>3+</sup>, subproducto complejo reacciona con O<sub>2</sub> conduciendo a la formación de los radicales O<sub>2</sub><sup>-•</sup> / HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, otro mecanismo generado en la reacción a pH cercano a la neutralidad es la acción fotocatalítica heterogénea ya que el hidróxido de hierro se formó durante el tratamiento. (Ruales-Lonfat et al., 2014).

A pesar que se ha descrito el efecto sinérgico de la absorción de la radiación UVA (presente en la radiación solar) de inducir daño en membrana celular y retrasar el crecimiento, así como también se ha atribuido daños debidos a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la desinfección térmica (Sharmin et al., 2014). Es evidente el efecto de la reacción foto-Fenton en la muerte celular. Como se observa de la figura 2 al finalizar el tratamiento fenton de 8 horas el recuento celular es cercano a 4 logs. En la Fotólisis 3 log.

Al llevar a cabo la observación al microscopio de las muestras irradiadas se observó que mientras las células de *E. coli* K 12 a tiempo cero tenían un tamaño celular promedio de  $1,5 \mu m$  para el 99% de células evaluadas, mientras que más de 98% alcanzaron valores entre (2 -  $3,5 \mu m$ ) después de 18 h en el medio DVC. Las células de *E. coli* K 12 elongadas pueden ser fácilmente reconocidos por la sonda ES-445, como se muestra en la figura 2.

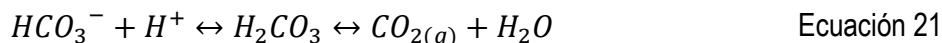
## **9 Evaluación del efecto de la concentración de hierro, concentración de peróxido y pH cercano a la neutralidad en la desinfección de la cepa *E. coli* K12 en agua subterránea mediante foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad**

El mejor desempeño en la desinfección por parte de reactor FF- R4 (pH: 6,78,  $H_2O_2$ : 10 mg.L<sup>-1</sup>, Fe<sub>total</sub>: 0,3 mg.L<sup>-1</sup>) se debió a que en pH 6,78 las especies de hierro presentes son  $(Fe(OH)_2)^+$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Fe(OH)_3$ , permitiendo una mayor generación de radicales hidroxilo a partir de la transformación de  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ . Otra razón que justifica la mayor eficiencia de esta combinación es que una alta concentración de peróxido permite un aumento en la generación de radicales hidroxilo, durante la conversión de  $H_2O_2$  catalizada por el hierro (II) (De la Cruz et al., 2013). Para el caso del tratamiento FF- R3 (pH: 7,65,  $H_2O_2$ : 10 mg.L<sup>-1</sup>, Fe<sub>total</sub>: 0,3 mg.L<sup>-1</sup>) su menor rendimiento en la desinfección se debe a que en pH 7,65 la especie predominante es  $Fe(OH)_3$ , la cual no es fotoactiva y disminuye la eficiencia del tratamiento foto Fenton (Rojas, 2014),

A los ensayos realizados se siguieron los parámetros pH, potencial óxido reducción, oxígeno disuelto, temperatura y peróxido de hidrógeno. El potencial de óxido reducción en todos los reactores de tratamiento Fenton y foto Fenton iniciaron en valores superiores a 200 mV indicando condiciones oxidantes debido a la adición del peróxido de Hidrógeno. El oxígeno disuelto en general fue superior a 4 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. La temperatura máxima registrada en los ensayos no superó los 38 °C lo cual garantiza que no hubo efecto de desinfección por temperatura y que no se presentó termo descomposición del peróxido de hidrógeno. Por último se observó que un consumo bajo de peróxido en la reacción foto Fenton llevado a cabo a pH 6,78 en agua Mili-Q, esto se asocia posiblemente a la baja concentración de iones que remueven o reaccionan con el radical hidroxilo, se resalta que a lo largo del proceso foto Fenton en el reactor FF-R4 sobre agua subterránea se consumió un máximo de 3,15 mgL<sup>-1</sup> de peróxido garantizando su residual, el seguimiento a los controles se reportan en el Anexo 7 y 8.

Durante el desarrollo de los ensayos se observó un aumento en el pH al final del tratamiento, alcanzando valores (entre 8,35 y 8,56 unidades). El aumento del pH en estos se relaciona, al efecto

de la agitación en los reactores y aumento de la temperatura, lo cual lleva a una disminución de la disolución del  $\text{CO}_2$  (ac) según la ley de Henry, generando pérdida de acidez por la transferencia de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera, esto lleva en consecuencia el incremento de pH hasta 8,3 donde la especie del equilibrio carbonato de mayor concentración es el ion bicarbonato el cual tiene capacidad amortiguadora (ver Ecuación 21) (Rojas, 2014)



La evaluación estadística mostró que el factor de mayor relevancia en el proceso es el pH, seguido del hierro y finalmente la interacción pH-hierro. El peróxido no mostró significancia en los tiempos evaluados. La interacción pH-peróxido presentó relevancia únicamente en el tiempo (90 min) de la reacción. Estas diferencias fueron establecidas con un  $p < 0,05$ , ver Anexo 9.

El tiempo (180 min) sobresale como el punto de coincidencia, en el cual la concentración de peróxido alcanzó un estabilidad en el consumo, situación que favorece la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hasta el final del tratamiento. Posiblemente en este punto la generación de reacciones de peroxidación lipídica en la membrana celular aumentó, condición favorable para evaluar la concentración de especies (subproducto de desinfección), como sugieren Shwetharani y Balakrishna en el (2014).

Para las combinaciones FF-R1 (pH: 6,78,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 10  $\text{mg.L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}_{\text{total}}$ : 0,9  $\text{mg.L}^{-1}$ ) y FF-R7 (pH: 7,65,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 10  $\text{mg.L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}_{\text{total}}$ : 0,9  $\text{mg.L}^{-1}$ ) en las cuales las concentraciones de hierro y peróxido tienen los niveles maximos, se presentó un gigantismo en la totalidad de las células observadas por microscopia de epifluorescencia para los tiempos de irradiación observados en la Figura 9. Es fuente de trabajos posteriores identificar que mecanismo de respuesta al estrés oxidativo generó este cambio en la fisiología.

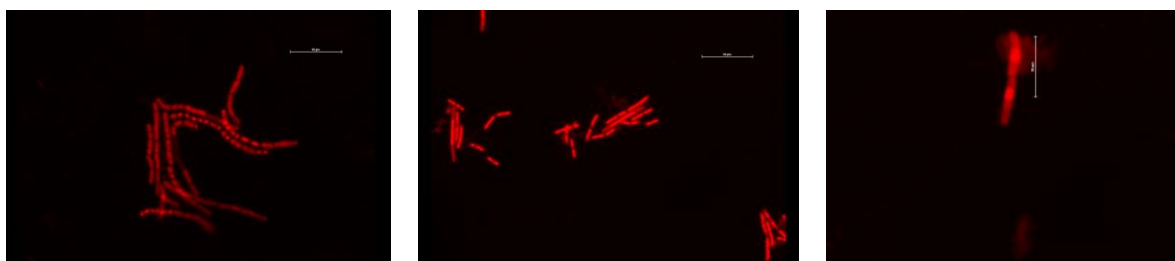


Figura 9. *E. coli* K 12 que presento tamaños promedios entre (10-15  $\mu\text{m}$ ), ensayo foto-Fenton con factores pH, hierro en niveles máximos

## 9.1 Comparación de la desinfección con foto Fenton y Cloro de aguas subterráneas

### 9.1.1 Determinación de la cinética de desinfección de la cepa *E. coli* K12 mediante foto-Fenton a pH neutro en agua subterránea, utilizando los valores de pH, hierro y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que fueron favorables del ensayo de factores

Se realizó un estudio cinético de desinfección donde se evaluó la Ecuación 22.

$$-\frac{dA}{dt} = -kAt \quad \text{Ecuación 22}$$

Donde,

t= tiempo de reacción

k= Constante de velocidad de reacción

A= Logaritmo base 10 del número de organismos viables por unidad de volumen

Posteriormente la expresión anterior se integra entre los límites t=(0, t) y A=(A<sub>0</sub>, A), y cambia a base n para obtener la forma lineal obteniendo la Ecuación 23

$$t^2 = \frac{2}{k} * \ln \frac{A_0}{A} \quad \text{Ecuación 23}$$

La pendiente de la recta obtenida representa el valor de la constante K.

Mediante la Figura 4 se observa que la desinfección de *E. coli* K12 a través de foto Fenton a pH neutro en agua subterránea cumple con esta ley cinética, ya que el coeficiente r<sup>2</sup> es 0,98.

Donde k es igual a  $-7,56 \times 10^{-5}$ . El tiempo de vida medio (t<sub>1/2</sub>) para una cinética valuada se obtiene a partir de la Ecuación 24.

$$t = \sqrt{\frac{2}{k} * \ln \frac{A_0}{A}} \quad \text{Ecuación 24}$$

$$t_{1/2}(\text{min}) = 135$$

Con el propósito de confirmar el daño ocasionado a la membrana celular de *E. coli* K12. se observó directamente por SEM el daño a la células durante el tratamiento foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad para las condiciones más favorables a escala de laboratorio como se muestra en la Figura 10.

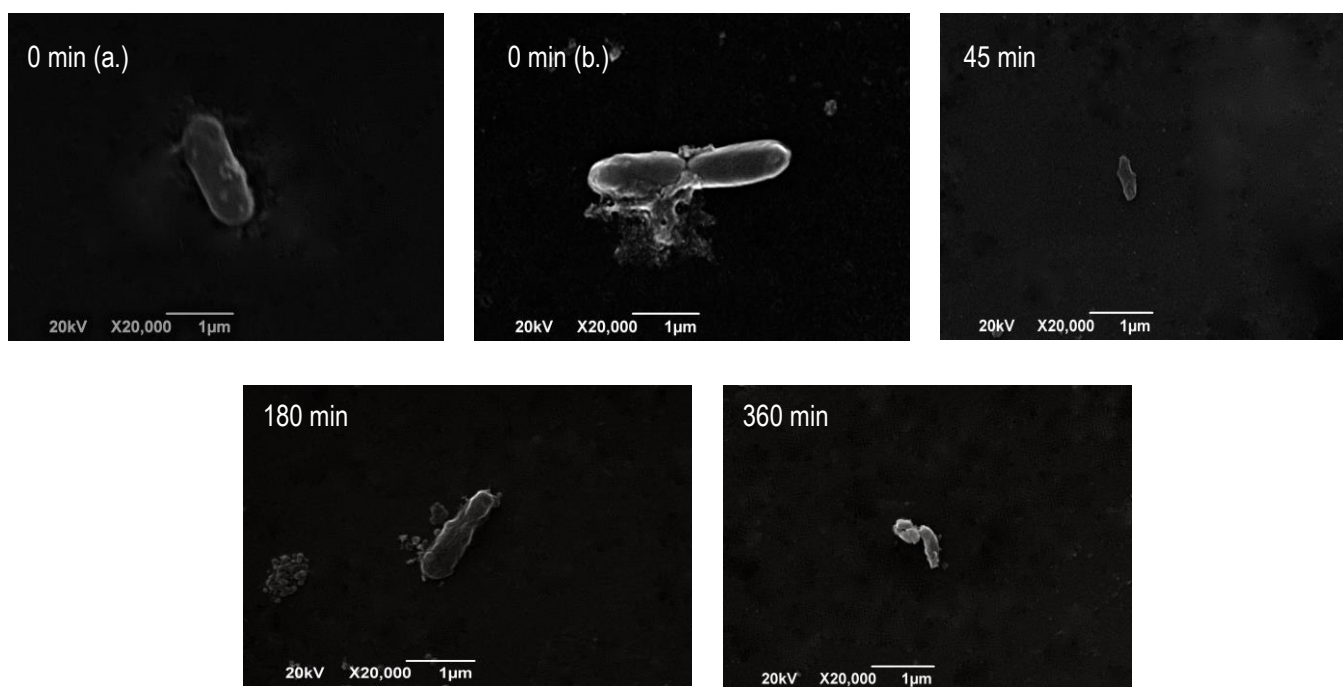


Figura 10. Seguimiento al daño en la membrana celular de *E.coli* K12 por Scanning electrón microscopy (SEM), a.) Tiempo cero sin elongar, b.) Tiempo cero célula elongada

Se observa pérdida de la integridad de la membrana celular lo que podría generar aumento de la permeabilidad, seguido por la descomposición de la envoltura celular que posiblemente causaría daño de proteínas, fuga de citoplasma y ácidos nucleicos.

#### 10 Desinfección de la cepa *E. coli* K12 en agua subterránea mediante cloración

Mediante un ensayo experimental, se determinó en el agua subterránea del Tiple a pH 6,78 que la dosificación de  $6.5 \text{ mg.L}^{-1}$  produce un residual de cloro libre superior a  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , esta concentración supera el cloro mínimo recomendado de  $0.2 - 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , (WHO 2011). Esta condición se usó para evaluar la desinfección de la cepa *E. coli* K12 durante 45 minutos.

El seguimiento a la población celular de *E. coli* K12 usando el método DVC-FISH, se muestra en la Figura 11.



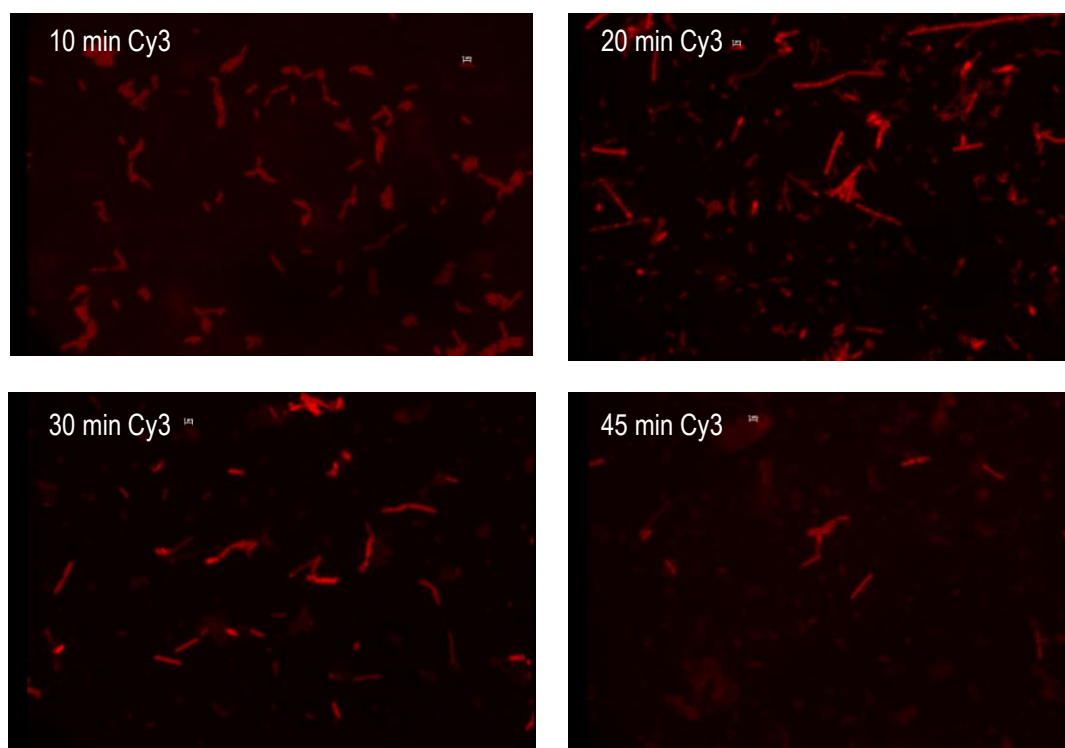


Figura 11. DVC-FISH recuento celular e identificación de células elongadas de *E. coli* K12 en agua subterránea después del proceso Cloración.

La desinfección por cloro fue evaluada siguiendo la reducción de las células viables, durante su seguimiento se presentó que una fracción de la población celular elongada que alcanzó tamaño entre 3,0 – 5  $\mu m$  (Figura 11), evidenciando cambios morfológicos debido al estrés oxidativo.

## 9.2 Cinética de Cloración

La cinética de desinfección con cloro obedece a la Ecuación 25.

$$\frac{dN}{dt} = -KNt \quad \text{Ecuación 25}$$

La pendiente de la recta obtenida representa el valor de la constante K, el orden de la reacción es dos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7.

Integrando y cambiando la base 10 se obtiene la Ecuación 26

$$t^2 = \frac{2}{K} \text{Log} \left( \frac{N_0}{N_t} \right) \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde,

K: -0,000499 para residuales de cloro libre

$$t^2 = \frac{2}{-0,0000499} \text{Log} \left( \frac{10^7}{0,5 * 10^7} \right) = 52,75 \text{ min}$$

#### 10. Comparación de la diferencia en las eficiencias de desinfección para los procesos foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad y cloración con hipoclorito de calcio (CaClO<sub>2</sub>) en fuentes de aguas subterránea

Los tratamientos foto-Fenton y cloración aplicados alcanzaron la desinfección en la matriz de agua subterránea sobre la cepa *E. coli* K12. La tabla 10 muestra que el tiempo para alcanzar el 99% de mortalidad de las células por el tratamiento foto Fenton es mayor 2,56 veces que el tratamiento de cloración. Lo anterior lo confirmó a la cloración como un tratamiento más eficaz, sin embargo los resultados también muestran el potencial del tratamiento foto-Fenton para alcanzar la desinfección. Se debe anotar que las fuentes de agua subterránea presentaron como máximo un conteo microbiológico de enterobacterias de  $5,18 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, por tanto los tiempos de desinfección reales en esta calidad de agua deben ser menores a los del presente estudio.

Para la cloración del agua subterránea de la comunidad del Tiple (corregimiento Candelaria) se necesita un tiempo de contacto mayor a 52,45 minutos y una concentración de cloro de 6,5 mg.L<sup>-1</sup> para alcanzar niveles seguros de desinfección. El tiempo y la concentración obtenidos son superiores a lo especificado por la OMS, esta entidad sugiere para muestras de agua no conocidas una dosis de 4 mg.L<sup>-1</sup> y un tiempo de contacto de 30 minutos para lograr un agua segura.

##### 10.1 Determinación del efecto de los iones presentes en el agua subterránea en la desinfección de la cepa *E. coli* K12 vía foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad

##### 10.2 Ensayo evaluación del efecto independiente de iones: (Mn<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, CO<sub>3</sub><sup>=</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)

El efecto de reducción de tiempo por los iones F<sup>-</sup> y Mn<sup>2+</sup> posiblemente se deba a que el manganeso genere efecto catalítico en la reacción de foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad y el ion fluoruro produzca la disolución de ferro oxihidroxidos los cuales en solución tienen propiedades foto catalíticas (Bokare y Choi., 2014; Weiping *et al.*, (2008)). Por el contrario los iones SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> que presenta efecto de incremento de tiempo en las concentraciones evaluadas. Este efecto puede asociarse a la eliminación de los radicales hidroxilo por parte de los iones sulfato y nitratos o el acomplejamiento del hierro por los fosfatos y cloruros Devi *et al.*, (2011). El ion bicarbonato no mostró diferencias con respecto al tratamiento en agua mili-Q.

La disminución de velocidad en la desinfección de la cepa *E. coli* K12 al estar presentes los cloruros se debe al acomplejamiento con el hierro impidiendo su acción catalizadora, reduciendo la producción de radicales hidroxilo Micó *et al* (2013), por la acción de los iones cloruro se baja el nivel de pH promoviendo la eliminación del radical OH<sup>\*</sup>, otra forma de inhibición es por la formación

del radical  $\text{Cl}_2^{\cdot-}$  que es uno de los radicales menos reactivos en el medio, su papel en la reducción de la materia orgánica es insignificante (Pignatello., 1992 citado por Luna *et al.*, 2012).

La prolongación del tiempo de desinfección debido a la presencia de los fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), se atribuye a la capacidad de remover los iones de hierro, a través de la formación de fosfato de hierro no soluble (Soler *et al.*, 2009).

El incremento del tiempo de la reacción al estar presentes los Sulfatos ha sido explicado por Soler *et al.*, 2009; Ikehata y Gamal El-Din, 2006, al identificarse este ion como un eliminador de radicales hidroxilo.

Este ensayo usando las concentraciones máximas naturales de los iones presentes, permitió identificar que el ion con efecto más relevante en el incremento de la velocidad de desinfección en la reacción foto Fenton a pH neutro es el Fluoruro y que el ion que genera una menor velocidad en la desinfección es el ion cloruro, sin embargo la concentración utilizada de este ion que corresponde a el nivel máximo de concentración de ion cloruro encontrado naturalmente fue en una sola muestra y el promedio de este fue casi 10 veces menor, sin embargo se observó que el ion fosfato en concentraciones muy bajas tiene efectos similares al nivel máximo de cloruros, por ello se considera más relevante la evaluación de los fosfatos en las etapa siguiente de interacciones de los iones.

### 10.3 Ensayo efecto combinado de iones: ( $\text{HCO}_3^-$ , $\text{F}^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{PO}_4^{3-}$ )

La Figura 8. muestra en el tratamiento foto Fenton a pH cercano a la neutralidad, que la combinación R4 ( $\text{F}^-$ : 1,2 mg.L<sup>-1</sup>;  $\text{SO}_4^{2-}$ : 13,2 mg.L<sup>-1</sup>;  $\text{PO}_4^{3-}$ : 0,06 mg.L<sup>-1</sup>;  $\text{HCO}_3^-$ : 216,8 mg.L<sup>-1</sup>), alcanzó la desinfección total en 270 min de irradiación, siendo la de menor tiempo entre todas las combinaciones. Este tratamiento corresponde a la concentración máxima de fluoruros naturalmente presente y las concentraciones mínimas de los otros iones, probablemente el tiempo fue menor a los otros tratamientos debido a que el ion fluoruro incrementa en solución la concentración de especies de hierro disueltas como oxihidroxidos, adicionalmente se pueden formar con el hierro complejos con los subproductos de la degradación celular, que son foto-activos en el espectro visible y por último las concentraciones de los iones fosfato y sulfato son tan bajas que no generan inhibición con la reacción foto Fenton. La combinación R3 ( $\text{F}^-$ : 1,2 mg.L<sup>-1</sup>;  $\text{SO}_4^{2-}$ : 935 mg.L<sup>-1</sup>;  $\text{PO}_4^{3-}$ : 0,06 mg.L<sup>-1</sup>;  $\text{HCO}_3^-$ : 745 mg.L<sup>-1</sup>), que presenta una concentración baja del ion fluoruro reportó desinfección a los 360 min, que es igual al control foto-Fenton sin iones. Este último aspecto permite evidenciar la influencia del ion fluoruro en la disolución de los catalizadores ferro oxihidroxidos ( $\alpha, \gamma, \delta - \text{FeOOH}$ ;  $\alpha, \gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ).

Se destaca además que la desinfección en el proceso foto Fenton se llevó a cabo a una velocidad mayor en el tratamiento a pH ácido (2,8 unidades) que a pH cercano a la neutralidad (7,01 unidades). Situación que se esperaría a pH ácido asociada al mayor consumo de peróxido (Soler *et al.*, 2009).

En el ensayo fotólisis alcanzó en la inhibición del crecimiento celular valores igual a 61,09% desde el tiempo 300 min y hasta el final del experimento. Igualmente sucede en la reacción fenton, la desinfección de *E. coli* K12 muestra una estabilidad en la inhibición celular igual al 56,75%, desde el tiempo 300 min y hasta el final del experimento.

Las células mantienen su forma (bacilo) y tamaño promedio entre ( $1 - 1,5 \mu m$  para la cepa bacteriana evaluada en este trabajo) en los primeros minutos de irradiación, después del minuto 180 cambian los tamaños de las células, una fracción del conteo celular alcanza tamaños entre ( $2,5 - 4 \mu m$ ), las restantes disminuyen su tamaño a valores entre ( $0,5 - 1,0 \mu m$ ) hasta alcanzar recuentos celulares cero, ver figura 12. La combinación de los iones R4, la cual presenta una concentración de ión fluoruro máxima, reveló un cambio en la morfología celular para los tiempos 45, 90 y 180 minutos, alcanzando longitudes entre ( $4,0 - 10 \mu m$ ). El cambio morfológico referenciado posiblemente es debido a que el ión fluoruro en concentración de  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  favorece la disolución de especies de hierro fotoactivas, las cuales pueden generar una mayor producción de ROS las cuales incrementan el stress oxidativo en la célula. ver figura 12.

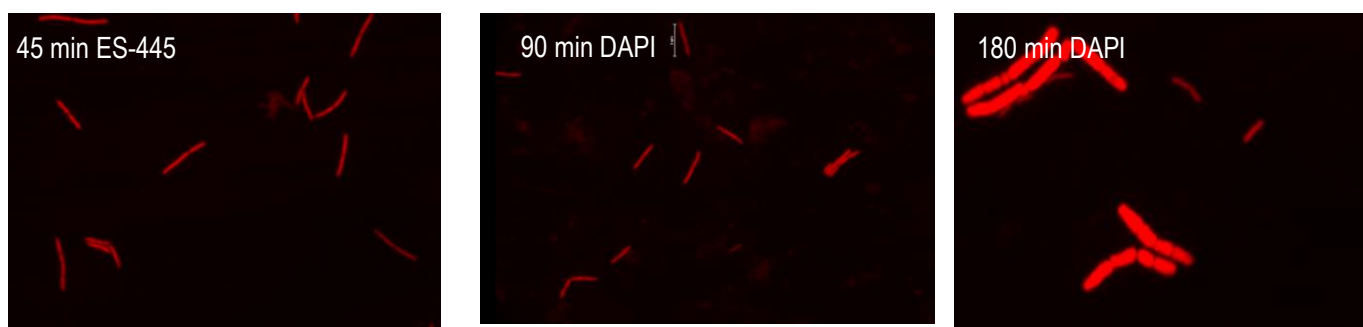


Figura 12. DVC-FISH recuento celular e identificación de células elongadas de *E. coli* K12 en agua subterránea después del proceso foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad

## CONCLUSIONES

El proceso foto-Fenton realizado a pH cercano a la neutralidad permitió la desinfección de *E. coli* K12 en el agua subterránea proveniente de una zona rural cercana al municipio de Candelaria-Colombia, usando el hierro natural, bajo las condiciones evaluadas a escala de laboratorio, mediante ensayos en un simulador solar Suntest.

Los resultados mostraron bajo las condiciones experimentales evaluadas en el proceso foto-Fenton que parte de las células de *E. coli* K12 entran en un esta VBNC a partir del tiempo 70 minutos, esto se debe por que el proceso fotoquímico induce este estado probablemente debido a un efecto combinado de la luz UV-A, y las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en el tratamiento.

Las actividad fotocatalítica de  $\gamma, \delta - FeOOH$  a pH cercano a la neutralidad, y asociado a la presencia de iones de fluoruro genera una foto-disolución de estas especies durante el tratamiento, garantizando una velocidad mayor en la desinfección respecto a la misma reacción en presencia de otros iones, demostrando la interferencia de este ion en el proceso foto-Fenton.

A partir de los ensayos realizados en agua Mili-Q, utilizando la concentración de iones reportada en un estudio previo, los iones que potencializan el tratamiento son  $F^-$ ,  $Mn^{2+}$ , se encontró que el mayor efecto negativo lo tiene el ión  $PO_4^-$  y  $Cl^-$ .

Los resultados de la evaluación de efecto de factores, mostrarón que el pH es el parámetro que en mayor medida influencia el proceso, seguido de la concentración de hierro y la interacción pH-peróxido. La combinación de factores que alcanza mayor eficiencia de desinfección es el pH 6,78 unidades, con una concentración natural de hierro igual a  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  y concentración de peróxido igual a  $10 \text{ mgL}^{-1}$ .

El estudio cinético de desinfección fotocatalítico, la constante cinética de degradación  $k$  es igual a  $-7,56 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  y el tiempo de vida medio de la desinfección durante el tratamiento es igual a 135 min. A diferencia del comportamiento cinético la cloración con hipoclorito de calcio que obedece al modelo cinético de chik, en donde el tiempo de vida media es igual a 52,45 min y la constante  $k$  es igual a  $-0,000499 \text{ min}^{-1}$ , condición que muestra como tratamiento más eficaz la cloración.

## RECOMENDACIONES

Determinar a qué rangos de longitudes de onda, las especies generadas durante el tratamiento foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad alcanzan niveles de foto-actividad, al irradiar muestras con rangos específicos de longitudes entre (380-450, 450-495, 495-570, 570-590, 590-620, 620-750) nm

Evaluar la actividad en la reacción foto catalítica del ión Fluoruro para ser utilizada como coayudante de la desinfección, aprovechando la concentración de (1,5 mg.L-1) recomendada por la OMS 2011 para agua potable, condición que posiblemente aceleraría la desinfección en el tratamiento foto-Fento

Cuantificar los radicales hidroxilo mediante espectrofotometría UV-Vis. y el evaluar la participación ión ferril mediante metodologías de inhibición de iones hidroxilo producidos durante el proceso de oxidación avanzada ( $\cdot\text{OH}$ ),

Evaluar la posibilidad de acople UV-B o UV-A / foto-Fenton, este acople se propone con la intención de debilitar la respuesta antioxidante de los microorganismos mediante la irradiación previa UVA-UVB.

Evaluar los límites del pH en el cual las especies fotoactivas dependientes del ión fluoruro para su solubilidad, mantienen su actividad.

Evaluar un acople de cloración después de alcanzar un tiempo de irradiación de 70 min (tiempo en el que se pierde la cultivabilidad celular), esto podría reducir las concentraciones y los tiempos de contacto de cloro necesarios para la desinfección, además de reducir la potencial formación de supproductos de desinfección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R. I., Krumholz, L. & Stahl, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762–770 (1990).
- Arizabalo, R. y Díaz, G. (1991). *La contaminación del agua subterránea y su transporte en medios porosos*. Instituto de geofísica. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- AWWA, APHA y WEF. (2005). *Standard Methods for the examination of water and waste water*. Edición 21, APHA, Washington, EEUU, 10-167pp.
- Braune, E. & Xu, Y., 2010. The role of ground water in Sub-Saharan Africa. *Ground Water*, pp. 229-238.
- Baudart J, Olaizola A, Coallier J, Gauthier V, Laurent P. (2005). "Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable Enterobacteriaceae cells in drinking water". *FEMS Microbiology Letters*;243:405–9.
- Bokare, A y Choi, W. (2014) Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials* 275: 121–135pp.
- Carra, I., García, J., Casas, J., Malato, S., Sánchez, J. (2014a) Phenomenological study and application of the combined influence of iron concentration and irradiance on the photo-Fenton process to remove micropollutants. *Science of the Total Environment* 478: 123–132pp.
- Carra, I., Malato, S., Jiménez, M., Maldonado, M.I., Sánchez, J.A. (2014b) Microcontaminant removal by solar photo-Fenton at natural pH run with sequential and continuous iron additions. *Chemical Engineering Journal* 235: 132–140pp.
- Cho, M., *et al.* (2004). "Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection." *Water Research* 38(4): 1069- 1077.
- Christensen P., Curtis T., Egerton T., Kosa S., Tinlin J., (2003). "Photoelectrocatalytic and photocatalytic disinfection of *E. coli* suspensions by titanium dioxide". *Appl. Catal. B: Environ.* 41, 371-386
- Colwell, 2009 RR Colwell Bacterias viables pero no cultivables
- CVC (1999). "Evaluación de la vulnerabilidad a la contaminación de las aguas subterráneas en el Valle del Cauca". Cali, Colombia, 26 p.
- CVC (2008). "Sistematización y Análisis de la información de la calidad del agua subterránea en el Valle del Cauca". Valle del Cauca, Cali Colombia, 69 p.
- Connick, R., Hepler, L., Hugus, Z., Kury, J., Latimer, W., Tsao, M. (1956) "The complexing of iron (III) by Fluoride Ions in aqueous solution: Free energies, heats and entropies". *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 78, pp.1827-1829.
- De la Cruz, N., Esquius, L., Grandjean, D., Magnet, A., Tungler, A., de Alencastro, L.F., Pulgarín, C. (2013) Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant. *Water Research* 47: 5836-5845pp.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S. & Pace, N. R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243, 1360–1363 (1989).

- Devi, L., Raju, K., Kumar, S. y Rajashekhar, K. (2011) Photo-degradation of di azo dye Bismarck Brown by advanced photo-Fenton process: Influence of inorganic anions and evaluation of recycling efficiency of iron powder. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42: 341–349 pp.
- DÍAZ J. (2012). AGUAS SUBTERRÁNEAS. UNIVERSIDAD DEL VALLE, CALI, COLOMBIA, 338PP
- DÍAZ R., GAMAZO C., LÓPEZ I. (2000). “MANUAL PRACTICO DE MICROBIOLOGÍA”. SEGUNDA EDICION, MASSON, BARCELONA (ESPAÑA).
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., and Wang, Y. (2007). “Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate”. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1349–1354.
- Ducrét, A., Chabaliér, M., and Dukan, S. (2014). Characterization and resuscitation of ‘non-culturable’ cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiol.* 14:3. vol: 10.1186 / 1471-2180-14-3
- Du Preez M, Conroy RM, Ligondo S, Hennessy J, Elmore-Meegan M, Soita A, et al. (2011). “Randomized intervention study of solar disinfection of drinking water in the prevention of dysentery in Kenyan children aged under 5 years”. *Environ Sci Technol* 45: 9315–23.
- EPA (Environmental Protection Agency) (2009). “Drinking Water Contaminants”. Disponible <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#content> [15/05/2013]
- Feng W, Nansheng D. (2000). Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. *Chemosphere* 41:1137–47.
- Fitts, C., 2002. Groundwater science. Primera edición ed. San Diego: Academic press.
- Foster, S., Hirata, R., Gomes, D., D’Elia, M. y Paris, M. (2002) Protección de la Calidad del Agua Subterránea. World Bank – Global Water Partnership Groundwater Management Advisory Team (GW•MATE)
- Foster, S., Garduño, H., Kemper, K., Tuinhof, A., Nanni, M. y Dumars, C (2006) Protección de la Calidad del Agua Subterránea definición de estrategias y establecimiento de prioridades. Sustainable Groundwater Management: Concepts and Tools GW•MATE Briefing Note Series Gestión Sustentable del Agua Subterránea Conceptos y Herramientas Serie de Notas Informativas Nota 8:1-6 pp.
- Garcia-Armisen, Pierre Servais (2004). “Enumeration of viable *E. coli* in rives and wastewaters by fluorescent in situ hybridization”. *Journal of Microbiological Methods* 58: 269-279
- García-Fernández I., Polo-López M.I., Oller I., Fernández-Ibáñez P. (2012). “Bacteria and fungi inactivation using Fe<sup>3+</sup>/sunlight, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/sunlight and near neutral photo-Fenton: A comparative study”. *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 121–122, página 20–29.
- Gatto, N. y otros, 2009. Well-Water Consumption and Parkinson’s disease in Rural California. *Environmental Health Perspectives*, 117(12), pp. 1912-1918.
- Gutiérrez, H. (2004) Selección de insecticidas usados en el cultivo de yuca. Tesis de Grado para optar por el título de Magister en Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Escuela de Ingeniería de los recursos naturales y del ambiente. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Colombia
- Herrmann, J. M. (2005). Destrucción de contaminantes orgánicos por fotocatalisis heterogenea. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. M. A. Blesa and J. Blanco. San Martín, Editorial Escuela de Posgrado Universidad Nacional de San Martín: 147-164.



- Hiscock K (2005) Hydrogeology: Principles and Practice. Blackwell Science, Maden.
- IDEAM, 2010. Estudio Nacional del Agua, Bogotá D.C.: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.
- Ikehata, K. y El-Din M (2006) Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: a review. *NRC* 5:81-135 pp.
- Jyrkama, M. y Sykes, J. (2007). The impact of climate change on spatially varying groundwater recharge in the grand river watershed (Ontario). *Journal of Hydrology* 338: 237-250 pp.
- Legues M., Franco G., Bertin p. (2002). "Estudio piloto de la fusión PML/RARa por el método de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en leucemia aguda promielocítica". *Rev. Méd. Chile* v.130, n.7, pp. 737-744
- Li Laam., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P. (2014). "The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens". *Front. Microbiol.* 5:258.
- Lu, W., Jiang, H., Hu, F., Jiang, L., Shen, Z. (2011) "A novel chemosensor based on Fe(III)-complexation for selective recognition and rapid detection of fluoride anions in aqueous media". *Tetrahedron*, Vol. 67, pp. 7909-7912.
- Luna, A., Chiavone-Filho, O., Machulek, A., Moraes, J.d., Nascimento, C. (2012). "Photo-Fenton oxidation 111: 10 -17pp. of phenol and organochlorides (2,4-DCP and 2,4-D) in aqueous alkaline medium with high chloride concentration". *Journal of Environmental Management*.
- Maldigan, M., Martinko, J.M., Parker, J., (2006). Brock Biología de los microorganismos. 10ª edición. Prentice Hall.
- Munakata N, Kuo J (2014) Disinfection Processes. *Water Environ. Res.* 86:1250-1273. Doi: 10.2175/106143014X4031280667651
- Mc Dougald D, Rice SA, Weichert D, Kjelleberg Sa. (1998). "Nonculturability: adaptation or debilitation?". *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 25,1/9 pp.
- Medina G. (2002). Plan de Manejo para la Protección de las Aguas Subterráneas en el Valle del Cauca. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca - CVC. Colombia
- Mejía, Diego. (2014). Diagnóstico sobre la calidad fisicoquímica y microbiológica de acuíferos superficiales en dos veredas del municipio de Candelaria. Tesis de Grado en elaboración. Programa académico de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Facultad de Ingeniería. Universidad del Valle. Colombia
- Micó, M., Bacardit, J., Malfeito, J. y Sans, C. (2013) Enhancement of pesticide photo-Fenton oxidation at high salinities. *Applied Catalysis B: Environmental* 132-133:162– 169 pp.
- Micó, M., Zapata, A., Maldonado, M., Bacardit, J., Malfeito, J., Sans, C. (2014) Fosetyl-Al photo-Fenton degradation and its endogenous catalyst inhibition. *Journal of Hazardous Materials* 265: 177– 184pp.
- Moreno, L. (2011) "Desarrollo de un Modelo Cinético para la Desinfección Fotocatalítica de Agua Contaminada con *E. Coli*". Tesis Maestría, Universidad Industrial de Santander, 17p
- Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J., Jiménez A., Ferrus A. (2007). "Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water" *Journal of WATER RESEARCH* 41 (2007) 3490– 3496
- Moncayo-Lasso A., Sanabria J., Pulgarin C. y Benítez N. (2009). "Simultaneous *E. coli* inactivation and NOM degradation in river water via photo-Fenton process at natural pH in solar CPC reactor". *Chemosphere*, vol. 77, página 296–300.

- Msilimba, G. & Wanda, E., 2013. Microbial and geochemical quality of shallow well water in high-density. *Physics and Chemistry of the Earth*, Issue 66, pp. 173-180.
- National Academy of Sciences (2008) Agua subterránea. Disponible en: <http://www.drinking-water.org/html/es/Sources/Renewable-or-Non-renewable-Groundwater.html> (Consultado el 20 de Mayo de 2013)
- Ndounla J., Spuhler D., Kenfack S., Wéthéd J., Pulgarin C. (2013). "Inactivation by solar photo-Fenton in pet bottles of wild enteric bacteria of natural well water: Absence of re-growth after one week of subsequent storage". *Applied Catalysis B: Environmental*, vol.129, página 309 – 317.
- Ndounla J., Kenfack S., Wéthéd J., Pulgarin C. (2014a). "Relevant impact of irradiance (vs. dose) and evolution of pH and mineral nitrogen compounds during natural water disinfection by photo-Fenton in a solar CPC reactor" *Applied Catalysis B: Environmental*, vol.148 - 149, página 144 –159.
- Ndounla J., Pulgarin C. (2014b). "Evaluation of the efficiency of the photo Fenton disinfection of natural drinking water source during the rainy season in the Sahelian region". *Science of the Total Environment*, Vol. 493, página 229–238
- Oliver, J. D. (2011). "Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria". *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 415–425. pp.
- Olmedo Sánchez, T. (2008). Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro. Efectos sobre la salud. *Higiene y Salud Ambiental*, (8), 335–342.
- Ortega-Gómez E., Fernández-Ibáñez P., Ballesteros M., Polo-López M. (2012). "Water disinfection using photo-Fenton: Effect of temperature on *Enterococcus faecalis* survival". *Water Research*, vol.46, página 6154 -6162
- Pignatello JJ, Oliveros E, MacKay A (2006) Advanced oxidation process for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Crit Rev Env Sci Tec* 36:1-84. Doi: 10.1080/10643380500326564
- Pignatello J., Oliveros E., Mackay A., (2007). "Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 36:1–84pp.
- Pinto, D., Santos, M. A., and Chambel, L. (2013). "Thirty years of viable but non- culturable state research: unsolved molecular mechanisms". *Crit. Rev. Microbiol.*
- Rengifo J., Castaño O., Janeth S. (2013). "Culturability and Viability of *Salmonella* Typhimurium during Photo-Fenton Process at pH 5.5 under Solar Simulated Irradiation" *Journal of Water Resource and Protection*, Vol 5, 21-27
- Rincón A.G. y Pulgarin C. (2005). "Comparative evaluation of Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> photoassisted processes in solar photocatalytic disinfection of water". *Appl. Catal. B: Environ.* Vol.63, página 222.
- Rincón A.G. y Pulgarin C. (2007). "Absence of *E. coli* regrowth after Fe<sup>+3</sup> and TiO<sub>2</sub> solar photoassisted disinfection of water CPC solar photoreactor". *Catalysis Today*, 124, página 204–214.
- Rodríguez-Chueca J., Mosteo R., Ormad M., Ovelleiro J. (2012). "Factorial experimental design applied to *Escherichia coli* disinfection by Fenton and photo-Fenton processes". *Solar Energy*, vol. 86, página 3260–3267.
- Rodríguez-Chueca J., López M.I., Mosteo R., Ormad M.P., Fernández-Ibáñez P. (2014) "Disinfection of real and simulated urban wastewater effluents using a mild solar photo-Fenton". *Applied Catalysis B: Environmental*, vol 150–151, página 619–629.

- Rivera S. (2011) "Estandarización De Un Método Microbiológico Para Cuantificación De Salmonella Sp Y Shigella Sp. Y Validez De Dos Métodos De Cuantificación, Empleados En El Diagnostico De Salmonella Sp., Presente En Aguas Artificiales Tratadas Mediante El Proceso De Desinfección foto-Fenton". Tesis de Magíster en Ciencias Básicas Médicas. Universidad del Valle Facultad de Salud.
- Ruales-Lonfat C., Barona J., Moncayo-Lasso A., Benites N., Pulgarín C. (2014). "Iron-catalyzed low cost solar activated process for drinking water disinfection in Colombian rural areas". Technologies for Sustainable Development. Switzerland Springer International Publishing; p. 1–16.
- Ruales-Lonfata C., Benítez N., Sienkiewicz A., Pulgarina C. (2014). "Deleterious effect of homogeneous and heterogeneous near-neutral photo-Fenton system on *Escherichia coli*. Comparison with photo-catalytic action of  $\text{TiO}_2$  during cell envelope disruption" *Applied Catalysis B: Environmental*, Volumes 160–161, Pages 286–297
- Sharmin Z., Sabina Y., Yasuhiro I., Chirapom a., Mohammad L. (2014). Low-Cost Sustainable Technologies for the Production of Clean Drinking Water, *Journal of Environmental Protection*, Vol. 5, pp 42-53
- Shwertharani, R., Jyothi, P., Balakrishna G. (2014). "Photoactive Titania Float for Disinfection of Water; Evaluation of Cell Damage by Bioanalytical Techniques" *Photochemistry and Photobiology*, 2014, 90: 1099–1107
- Soler J., García-Ripoll A., Hayek N., Miro, P., Vicente R., Arques A., Amat A.M. (2009). "Effect of inorganic ions on the solar detoxification of water polluted with pesticides". *Water Research*, vol.43, página 4441–4450.
- Spuhler, D., Rengifo-Herrera. J. A., Pulgarin, C. (2010). "The Effect of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the Photo-Fenton Reagent at near Neutral pH on the Solar Disinfection (SODIS) at Low Temperatures of Water Containing *Escherichia coli* K-12," *Applied Catalysis B: Environmental*, Vol. 96, No. 1-2, pp. 126-141.
- Taylor M., Harrison P. (1999). "Ecological Effects of Endocrine Disruption: current evidence and research priorities". *Chemosphere*, Vol. 39, No. 8, página 1237 – 1248.
- Tizaoui C., Karodia N y Abuowais M. (2010) Kinetic study of the manganese-based catalytic hydrogen peroxide oxidation of a persistent azo-dye. *J ChemTechnol Biotechnol*. 85: 234–242pp
- Trevors, 2011. (VBNC) "bacterias viables pero no cultivables: la expresión de genes en células planctónicas y biofilm". *J. Microbiol. Meth*, 86, pp 266-273
- Villarino, A., Bouvet, O., Regnault, B., Martin-Delautre, Grimon, P., Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells, *Research in Microbiology*, Volume 151, Issue 9, November 2000, Pages 755-768, ISSN 0923-2508,
- Von Sperling, M., 2012. Introducción a la calidad del agua y al tratamiento de aguas residuales. Primera edición ed. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño.
- Weiping Du., Yiming Xu and Yansong Wang. (2008). "Photoinduced Degradation of Orange II on Different Iron (Hydr)oxides in Aqueous Suspension: Rate Enhancement on Addition of Hydrogen Peroxide, Silver Nitrate, and Sodium Fluoride", *Langmuir*, Vol. 24, pp.175-181
- Wist J, Sanabria J, Dierolf C, Torres W, Pulgarin C. Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2002;147(3):241
- Wong, H.-C., and Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 96, 359–366. doi: 10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x
- WHO (World Health Organization) (2010). "Drinking Water Quality in the South – East Asia Region".

WHO (2006). Chemical aspects. Guidelines for Drinking-water Quality. WHO. Geneva.

WHO (World Health Organization) (2008). "Guidelines for Drinking-water Quality" Vol. 1, Tercera edición, WHO, pp 515.

## ANEXOS

## ANEXO 1. Demanda de cloro

Tabla 1.1. Resultados ensayo para determinar la curva de demanda de cloro en la muestra de agua subterránea recolectada en el corregimiento el Tiple.

<b>Patron:</b>		100 mg Ca(ClO) <sub>2</sub> .L-1				
<b>Botellas ámbar de 20 ml:</b>		24 botellas				
<b>Celda para cloruros:</b>		cilindro de 5 ml				
<b>Curva de la demanda:</b>		(0 - 10 mg.L-1)				
<b>Tiempo de contacto de cloro:</b>		1 hr				
<b>Precloración - Dosis Optima agua subterránea volumen</b>						<b>20 ml</b>
Fecha: 22 - Dic - 2014						
Botella	Dosis de cloro (mgCl.L-1)	Volumen Patron	Factor Dil.	Cloro libre (mgCl.L-1)	hora de add CL	hora de medida
0	0,00	-	1,00	0,00	-	-
1	0,20	0,016	1,00	0,00	17:30	18:30
2	0,40	0,033	1,00	0,01	17:35	18:35
3	0,60	0,049	1,00	0,03	17:40	18:40
4	0,80	0,066	1,00	0,04	17:45	18:45
5	1,00	0,082	1,00	0,06	17:50	18:50
6	1,50	0,123	1,00	0,06	17:55	18:55
7	2,00	0,164	1,00	0,14	18:00	19:00
8	2,50	0,205	1,00	0,67	18:05	19:05
9	3,00	0,246	1,00	0,19	18:10	19:10
10	3,50	0,287	4,00	0,36	18:15	19:15
11	4,00	0,328	10,00	0,25	18:20	19:20
12	4,50	0,369	10,00	0,48	18:25	19:25
13	5,00	0,410	10,00	0,12	18:30	19:30
14	5,50	0,451	10,00	1,30	14:35	15:35
15	6,00	0,492	10,00	1,60	14:40	15:40
16	6,50	0,533	10,00	1,60	14:45	15:45
17	7,00	0,574	10,00	1,70	14:50	15:50
18	7,50	0,615	10,00	1,70	14:55	15:55
19	8,00	0,656	10,00	1,90	15:00	16:00
20	8,50	0,698	10,00	2,10	15:05	16:05
21	9,00	0,739	10,00	2,60	15:10	16:10
22	9,50	0,780	10,00	2,60	15:15	16:15
23	10,00	0,821	10,00	4,30	15:20	16:20

Sin embargo es claro que en la dosis de 6 mg/L se logra un cloro residual libre superior a 0,5 mg/L (recordemos que OMS recomienda un cloro residual mínimo de 0,2-0,5 mg/L, WHO 2011), entonces la dosis a adicionar puede ser la 6 ó 6,5 mg/L.

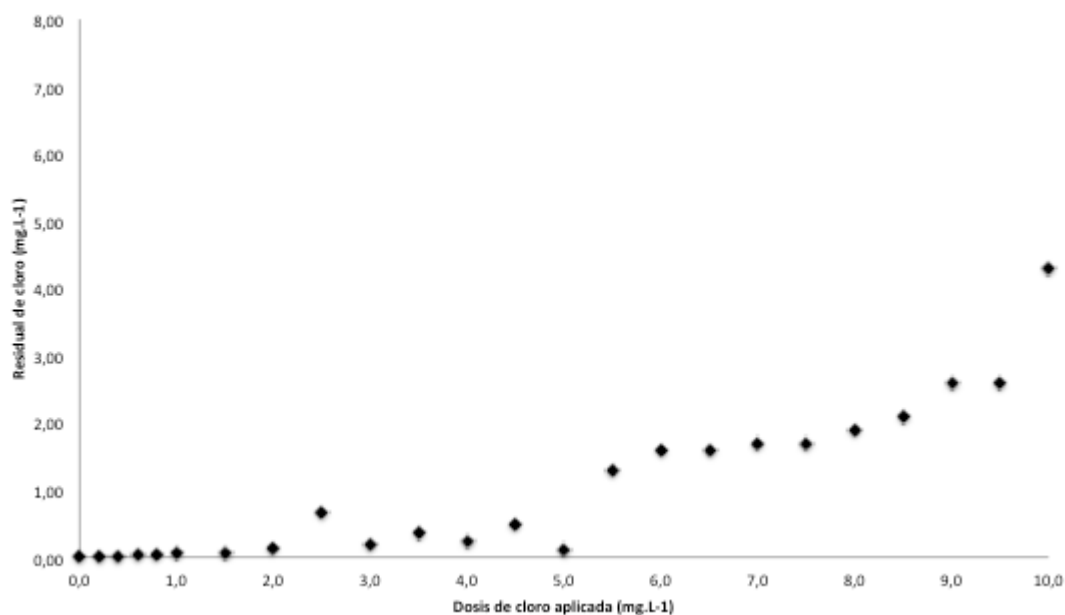


Figura 1.1. Curva de demanda de Cloro dosis optimizada para el agua subterránea recolectada en el corregimiento el Tiple.

## ANEXO 2. Diseño experimental para Ensayo de efecto de factores Hierro, pH y Peróxido

Clase de diseño: De Cribado

Nombre del Diseño: Factorial  $2^3$

### Diseño Base

Número de factores experimentales: 3

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 5

Número de corridas: 24

Grados de libertad para el error: 16

Aleatorizar: Sí

Factores	Bajo	Alto	Continuo
pH	-1.0	1.0	Sí
Peróxido	-1.0	1.0	Sí
Hierro Total	-1.0	1.0	Sí

Respuestas	Unidades
%Inhibición (t=45)	%
%Inhibición (t=90)	%
%Inhibición (t=180)	%
%Inhibición (t=270)	%
%Inhibición (t=360)	%

El diseño factorial fue obtenido del software "Statgraphics" con el fin de estudiar los efectos de 3 factores en 24 corridas. El diseño deberá ser ejecutado en 3 bloques. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.



### ANEXO 3. Diseño experimental para ensayo de efecto de factores $\text{CaClO}_2$ y pH

Clase de diseño: De Cribado

Nombre del Diseño: Factorial  $2^2$

#### Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 7

Número de corridas: 12

Grados de libertad para el error: 7

Aleatorizar: Sí

<b>Factores</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Continuo</b>
pH	-1,0	1,0	Sí
$\text{CaClO}_2$	-1,0	1,0	Sí

<b>Respuestas</b>	<b>Unidades</b>
%Inhibición (t=5)	%
%Inhibición (t=10)	%
%Inhibición (t=15)	%
%Inhibición (t=20)	%
%Inhibición (t=30)	%
%Inhibición (t=40)	%
%Inhibición (t=45)	%

El diseño factorial fue obtenido del software "Statgraphics" con el fin de estudiar los efectos de 2 factores en 12 corridas. El diseño deberá ser ejecutado en 3 bloques. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

#### ANEXO 4. Decaimiento de la población celular de *E. coli* K12 en ensayo de iones efecto individual

Tabla 4.1. Comportamiento de la población celular bajo foto-Fenton de pH cercano a la neutralidad, efecto iones individuales

TIEMPO (min)	Población celular - Log (UFC.mL-1)									
	Fluoruros		Manganeso		Cloruros		Sulfatos		Fosfatos	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2
<b>45</b>	6,42	6,63	6,48	6,73	-	-	-	-	-	-
<b>90</b>	6,30	6,47	4,31	6,39	6,75	6,72	4,33	4,22	6,58	6,64
<b>120</b>	3,51	3,70	4,20	4,18	6,72	6,72	3,90	4,00	3,95	4,03
<b>180</b>	<b>2,78</b>	2,78	3,89	3,99	6,70	4,45	3,76	3,56	3,57	3,56
<b>210</b>	0,00	<b>1,60</b>	3,66	3,81	4,31	4,32	3,10	3,02	3,51	3,45
<b>240</b>	0,00	0,00	<b>2,27</b>	<b>2,52</b>	4,24	4,20	<b>2,75</b>	<b>2,48</b>	3,26	3,20
<b>270</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	4,06	4,11	0,00	0,00	<b>2,30</b>	<b>2,82</b>
<b>300</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	4,11	4,11	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>330</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	4,11	<b>3,81</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>360</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>3,32</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>390</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>420</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>450</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>480</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

E1: primer ensayo

E2: segundo ensayo (replica)

## ANEXO 5. Diseño experimental para Ensayo de efecto de lones

Clase de diseño: De Cribado

Nombre del Diseño: Factorial  $2^4$

### Diseño Base

Número de factores experimentales: 4

Número de bloques: 2

Número de respuestas: 5

Número de corridas: 32

Grados de libertad para el error: 20

Aleatorizar: Sí

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Continuo</i>
Fluoruros	-1.0	1.0	Sí
Sulfato	-1.0	1.0	Sí
Carbonato	-1.0	1.0	Sí
Fosfato	-1,0	1,0	Si

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
%Inhibición (t=90)	%
%Inhibición (t=180)	%
%Inhibición (t=270)	%
%Inhibición (t=360)	%

El diseño factorial fue obtenido del software “Statgraphics” con el fin de estudiar los efectos de 4 factores en 32 corridas. El diseño deberá ser ejecutado en 2 bloques. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

## ANEXO 6. Características físico-químicas del agua subterránea corregimiento El Tiple

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de agua subterránea fueron obtenidos en un estudio previo realizado por Mejía (2014), donde se evaluó las aguas subterráneas perteneciente a los corregimientos El Tiple, La Regina y Palma seca, a través de 8 monitoreos en 47 puntos. La caracterización fisicoquímica del agua para los corregimientos el Tiple (sitio de muestreo), La Regina y Palma seca, se presenta en la Tabla 6.1 y la concentración de los iones se incluye en la Tabla 6.2

Tabla 6.1. Caracterización fisicoquímica del agua subterránea de los corregimientos El Tiple, La Regina y Palma seca

Parámetro	pH	T°	Cond	OD	COT	Color		Turbiedad
Unidades	Unidades	°C	( $\mu\text{Scm}^{-1}$ )	(mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	(mgL <sup>-1</sup> )	(UPC)	UV <sub>254</sub>	NTU
Máximo	7,65	28,50	3740,00	2,61	26,27	26,50	0,80	2,83
Mínimo	6,78	21,60	273,00	0,04	1,99	0,20	0,00	0,26
Mediana	6,97	25,2	478	0,88	3,22	1,8	0,019	0,54

Fuente: Mejía (2014)

Uv 254 : medida del nivel de sustancias orgánicas en el agua

Tabla 6.2. Iones valorados en la caracterización fisicoquímica del agua subterránea de los corregimientos El Tiple, La Regina y Palma seca

Parámetro	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	Hierro	F <sup>+2</sup>	Mn <sup>+2</sup>	Cu	Ca	Mg
	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	Total	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	mg.L <sup>-1</sup>
Máximo	175,81	4,67	193	1,2	1,65	595,97	935	0,93	0,26	1,53	-	118,14	46,17
Mínimo	0	0,17	1	0,15	0,06	83,61	13,2	0,07	<0,052	0,05	-	78,09	13,37
Mediana	7,7	1,09	20	1,03	0,48	353,13	58,7	0,45	-	0,27	<0,09	-	-

Fuente: Mejía (2014)

En la 6.3 se presenta la caracterización del pozo en Candelaria - Valle (corregimiento el Tiple) del cual fueron tomadas las muestras de agua subterránea tratada en el estudio. Las muestras presentan características favorables para los tratamientos foto Fenton al tener presencia de hierro natural y baja turbiedad.

Tabla 6.3. Caracterización del agua subterránea corregimiento El Tiple

Parámetro	pH	T°	Cond	OD	COT	Color	UV <sub>254</sub>	Turbiedad	Hierro	Hierro
Unidades	Unidades	°C	( $\mu\text{Scm}^{-1}$ )	(mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	(mgL <sup>-1</sup> )	(UPC)		NTU	total	+2
									(mgL <sup>-1</sup> )	(mgL <sup>-1</sup> )
Máximo	7,07	25,30	1084,00	0,76	3,90	7,20	0,02	1,21	0,70	<0,052
Mínimo	6,86	24,50	423,00	0,26	2,30	0,50	0,00	0,39	0,22	<0,052
Mediana	6,91	25,30	756,00	0,67	3,71	0,90	0,02	0,50	0,31	<0,052

## Características microbiológicas del agua subterránea corregimiento El Tiple

En la Tabla 6.4. se presenta la caracterización del pozo en Candelaria - Valle (corregimiento el Tiple) del cual fueron tomadas las muestras de agua subterránea tratada en el estudio.

Tabla 6.4. Caracterización microbiológica del agua subterránea corregimiento el Tiple

Parámetro	Enterobacterias T (UFC/100 ml)	Coliformes T (UFC/100 ml)	Coliformes F (UFC/100 ml)	Enterococos (UFC/100 ml)	Fagos (UFC/100 ml)	<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)
<b>Tiple Abajo</b>						
<b>Promedio</b>	2,36E+06	8,58E+03	3,75E+02	9,60E+02	8,60E+01	0,00E+00
<b>%CV</b>	4,21E+02	2,24E+02	1,46E+02	1,57E+02	2,47E+02	0,00E+00
<b>Rango</b>	0 - 5,18E+07	0 - 7,64E+04	0 - 1,59E+03	0 - 5,45E+03	0 - 6,82E+02	0,00E+00

Enterobacterias T: Enterobacterias totales - Coliformes T: Coliformes totales - Coliformes F: Coliformes fecales – CV: Coeficiente de variación

## ANEXO 7. Comportamiento de la concentración de Hierro y peróxido durante el tratamiento.

Se realizó un seguimiento al consumo de peróxido y concentraciones de Fe(II) en el tiempo, así como el pH al inicio y al final de la reacción el cual se presenta en Figura 7.1.

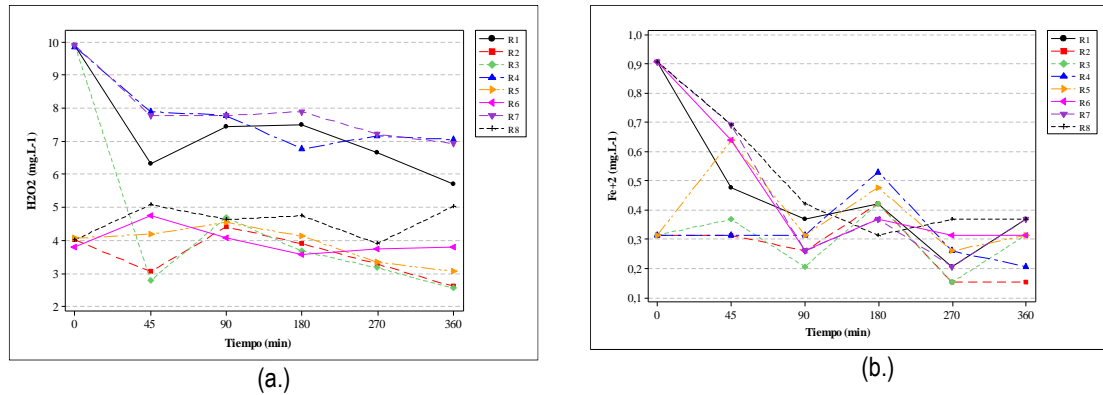


Figura 7.1. Seguimiento de (b.) hierro y (a.) peróxido en ensayo de factores

También se realizó seguimiento al pH inicial y final para cada uno de los tratamientos de diseño factorial 2<sup>3</sup>. Los resultados se presentan en la Tabla 7.1.

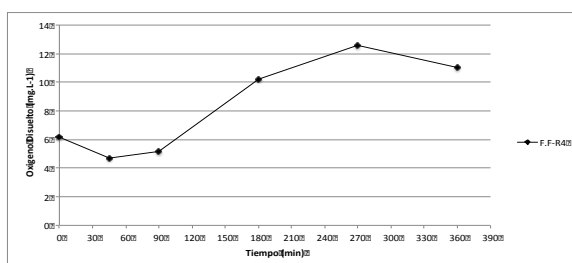
Tabla 7.1. Determinación del pH inicial y final para cada experimento

REACTOR	pH	Peróxido	Hierro total	pH inicial (unidades)	pH final (unidades)
R1	-	+	+	6,78	8,49
R2	-	-	-	6,78	8,47
R3	+	+	-	7,65	8,50
R4	-	+	-	6,78	8,60
R5	+	-	-	7,65	8,56
R6	+	-	+	7,65	8,51
R7	+	+	+	7,65	8,49
R8	-	-	+	6,78	8,52
<b>Blanco</b>					
(Oscuridad, Fe 0,3mgL <sup>-1</sup> , pH 6,78)				6,78	8,37
<b>Fenton</b>					
(Osc., Fe 0,3; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10mgL <sup>-1</sup> , pH 6,78,)				6,78	8,35
<b>Fotólisis</b>					
(irradiación, Fe 0,3mgL <sup>-1</sup> , pH 6,78)				6,78	8,39

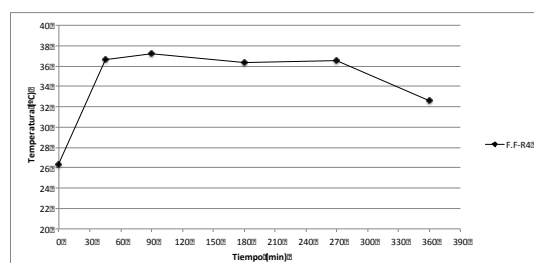
## ANEXO 8. Seguimiento a Parámetros de control para las combinación de factores F.F - R4 (pH 6,78 unidades, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mgL<sup>-1</sup> y hierro total 0,3 mgL<sup>-1</sup>) en la desinfección de la cepa *E. coli* K12

El seguimiento de la temperatura (°C), Oxígeno disuelto (OD), pH y Potencial oxido-reducción (ORP) se realizó mediante 6 mediciones, en los tiempos 0, 45, 90, 180, 270, y 360 min, los resultados se presentan en la Figura 8.1

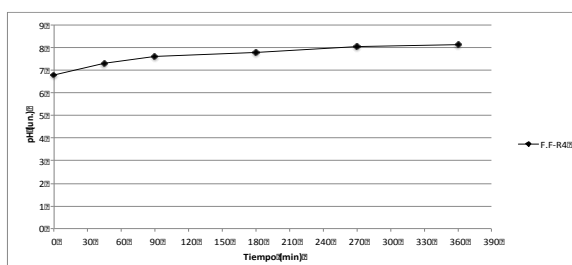
a) Oxígeno disuelto (mgL<sup>-1</sup>)



b) Temperatura (°C)



c) pH (unidades)



d) Potencial oxido-reducción (mv)

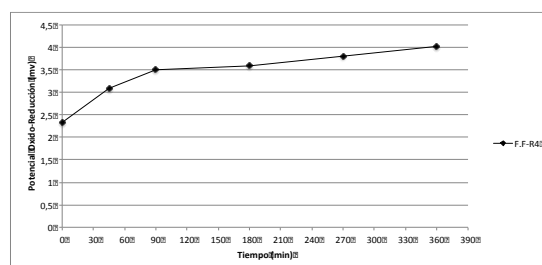


Figura 8.1. Seguimiento de los parámetros de temperatura, pH, oxígeno disuelto y potencial óxido-reducción para el tratamiento foto Fenton a pH cercano a la neutralidad en la desinfección de *E. coli* K12

El seguimiento de la concentración de Hierro (Fe<sup>+2</sup>) a través del tiempo se presenta en la Figura 8.2.

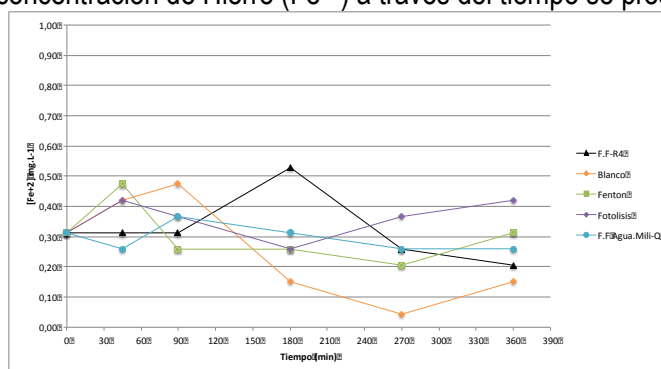


Figura 8.2. Seguimiento de Hierro<sup>+2</sup> para los tratamientos foto Fenton pH 6,78 unidades (F.F-R4), foto Fenton pH 7,10 unidades (Agua Mili-Q), fotólisis (0,28 mgL<sup>-1</sup> Fe total/irradiación), Fenton pH 6,78 unidades (Fenton) y blanco (0,28mgL<sup>-1</sup> Fe total/Oscuridad)

El seguimiento de la concentración de peróxido a través del tiempo se presenta en la Figura 8.3.

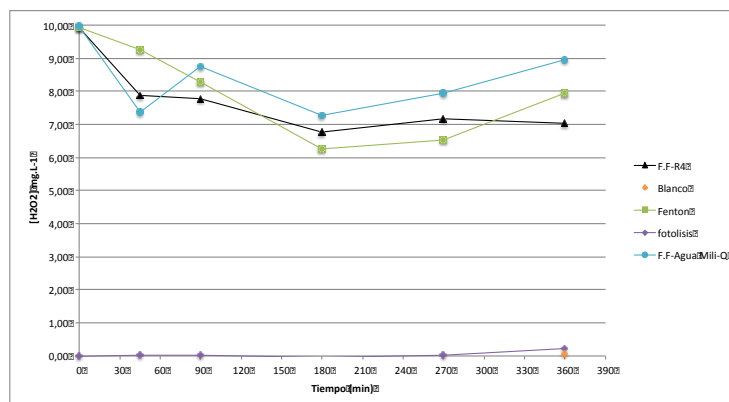


Figura 8.3. Seguimiento de peróxido para los tratamientos foto Fenton pH 6,78 unidades (F.F-R4), foto Fenton pH 7,10 unidades (Agua Mili-Q), fotólisis (0,28 mgL<sup>-1</sup> Fe total/irradiación), Fenton pH 6,78 unidades (Fenton) y blanco (0,28mgL<sup>-1</sup> Fe total/Oscuridad)



## ANEXO 9. Analisis ANOVA - Ensayo efecto factores: (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH, Fe total)

El análisis estadístico ANOVA se realizó con el software “Statgraphics”, utilizando los datos de la Tabla 9.1. El Statadvisor arrojó los siguientes resultados:

Con el fin de probar la significancia estadística de los efectos, se presenta la tabla ANOVA para cada tiempo de muestreo, los resultados se muestran en la Tabla 8.1 y Tabla 8.2

Tabla 9.1. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (45 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	150,0	1	150,0	2,23	0,1564
B:Peróxido	4,25042	1	4,25042	0,06	0,8051
C:Hierro	6,55215	1	6,55215	0,10	0,7595
AB	77,2568	1	77,2568	1,15	0,3012
AC	105,085	1	105,085	1,56	0,2309
BC	250,39	1	250,39	3,72	0,0731
Error total	1023,98	2	511,989	7,60	0,0053
Total (corr.)	1010,81	15	67,3876		

R-cuadrada = 61,5415 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 41,0303 porciento

Error estándar del est. = 8,209

Error absoluto medio = 5,44194

Estadístico Durbin-Watson = 2,74335 (P=0,9205)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,40156

Tabla 9.2. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (90 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	59,1262	1	59,1262	2,66	0,1235
B:Peróxido	0,0852042	1	0,0852042	0,00	0,9514
C:Hierro	24,3412	1	24,3412	1,10	0,3116
AB	75,5085	1	75,5085	3,40	0,0850
AC	177,943	1	177,943	8,02	0,0126
BC	35,8926	1	35,8926	1,62	0,2229
Error total	56,7954	2	28,3977	1,28	0,3069
Total (corr.)	332,955	15	22,197		

R-cuadrada = 56,3422 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 33,058 porciento

Error estándar del est. = 4,71137

Error absoluto medio = 2,44111

Estadístico Durbin-Watson = 2,45914 (P=0,7670)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,246075

Tabla 9.3. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (180 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	10,0751	1	10,0751	7,53	0,0151
B:Peróxido	0,650104	1	0,650104	0,49	0,4964
C:Hierro	10,0233	1	10,0233	7,49	0,0153
AB	0,650104	1	0,650104	0,49	0,4964
AC	9,9717	1	9,9717	7,45	0,0155
BC	0,624037	1	0,624037	0,47	0,5050
Error total	3,89882	2	1,94941	1,46	0,2640
Total (corr.)	20,0651	15	1,33768		

R-cuadrada = 64,1427 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 45,0188 porciento

Error estándar del est. = 1,15658

Error absoluto medio = 0,586597

Estadístico Durbin-Watson = 2,44636 (P=0,7579)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,227672

Tabla 9.4. Análisis de Varianza para porcentaje de inhibición (270 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	0,0000666667	1	0,0000666667	2,03	0,1743
B:Peróxido	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
C:Hierro	0,0000666667	1	0,0000666667	2,03	0,1743
AB	0,0000166667	1	0,0000166667	0,51	0,4867
AC	0,0000166667	1	0,0000166667	0,51	0,4867
BC	0,0000166667	1	0,0000166667	0,51	0,4867
Error total	0,000175	2	0,0000875	2,67	0,1019
Total (corr.)	0,000491667	15	0,0000327778		

R-cuadrada = 42,1569 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 11,3072 porciento

Error estándar del est. = 0,00572519

Error absoluto medio = 0,00375

Estadístico Durbin-Watson = 2,0625 (P=0,4333)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,0391949

La Figura 9.1 muestra el diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de inhibición de la cepa *E. coli* K12.

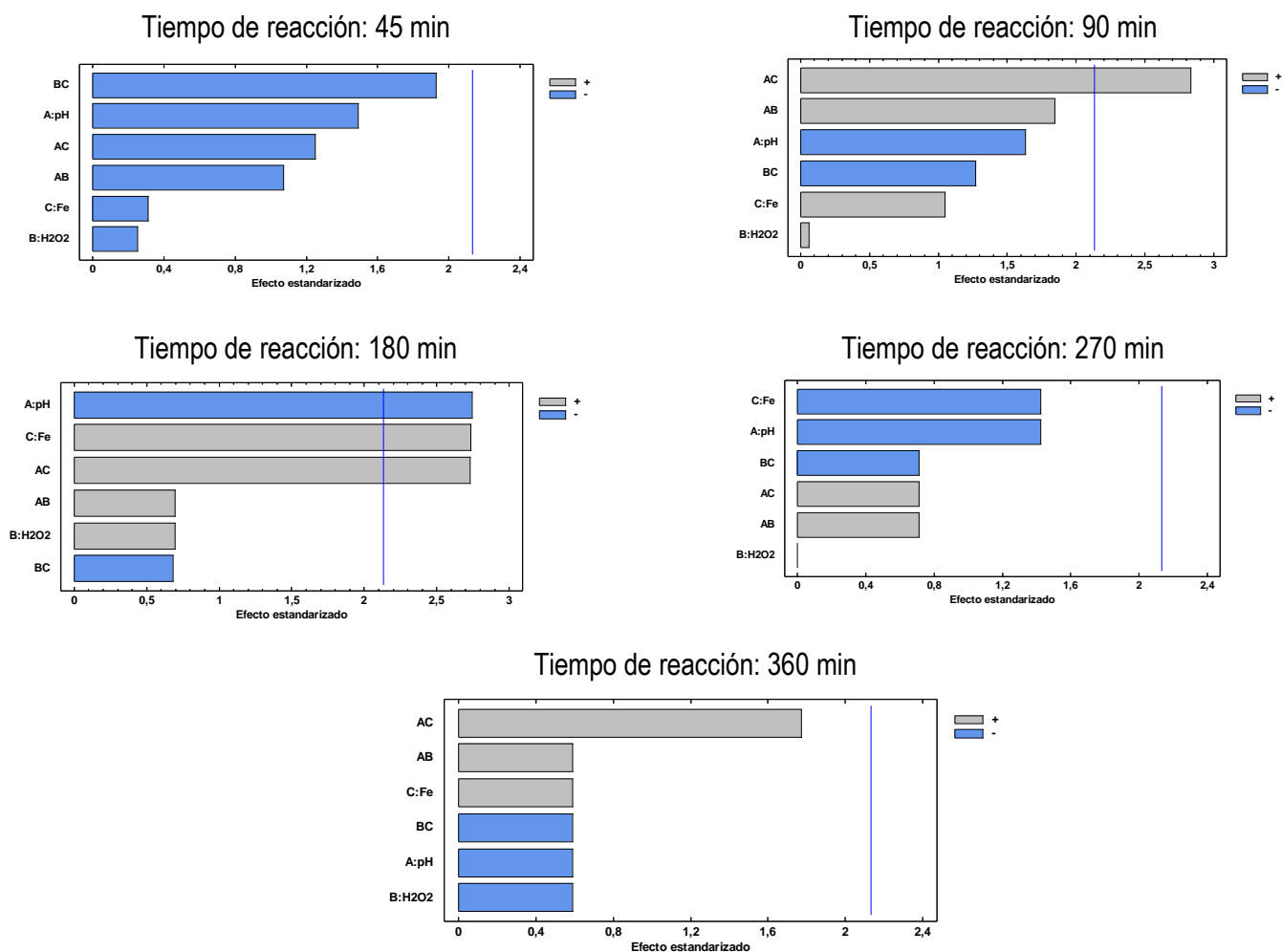


Figura 9.1. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido para la determinación de la significancia de los factores pH (A), peróxido (B) y hierro (C) en el porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana *E. coli* K12 para los tiempos 45 min, 90 min, 180 min, 270 min y 360 min del tratamiento foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad. El valor límite de la significancia está indicado por la línea vertical

La Figura 9.2. presenta los efectos principales de los factores peróxido, hierro total y pH.

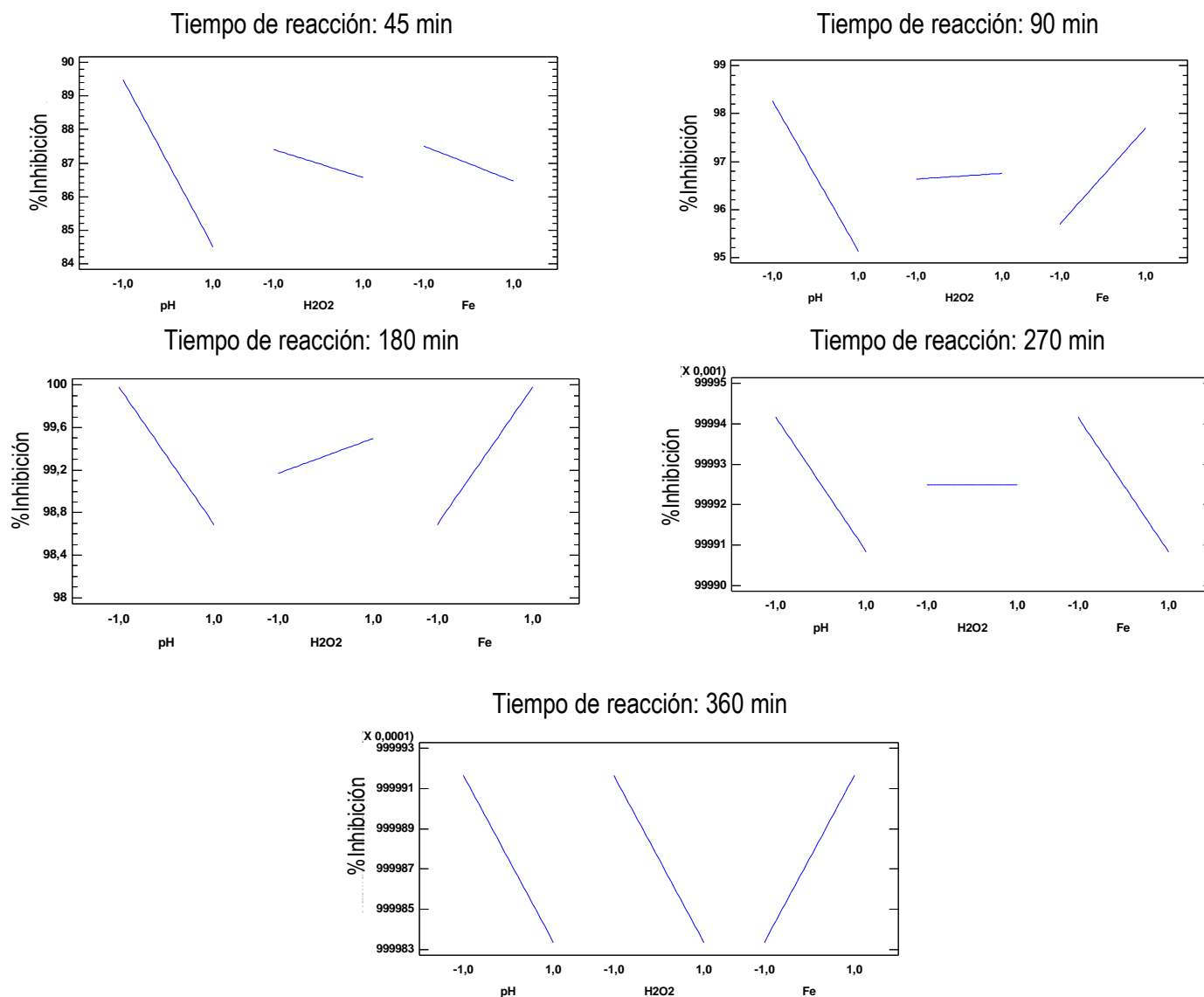


Figura 9.2. Diagrama de efectos principales obtenido para la determinación de la significancia de los factores pH, peróxido y hierro en el porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana *E. coli* K12 luego del tratamiento foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad

## ANEXO 10. ANOVA simple (Ensayo iones: Fluoruros, Cloruros, Fosfatos y Manganeseo)

El análisis estadístico ANOVA se realizó con el software “Statgraphics”, utilizando los datos de la Tabla 10.1 para los tiempos 90 y 180 minutos, teniendo como variable dependiente la inhibición de la cepa bacteriana de estudio en (%), como factor los iones y el número de niveles del experimento fue igual a 5. El Statadvisor arrojó los siguientes resultados:

Tabla 10.1. Anova para %Inhibición de *E. coli* K12 en 90 minutos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3674,19	4	918,547	12,74	0,0078
Intra grupos	360,56	5	72,112		
Total (Corr.)	4034,75	9			

Tabla 10.2. Anova para %Inhibición de *E. coli* K12 en 180 minutos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4360,38	4	1090,1	8385353,38	0,0000
Intra grupos	0,00065	5	0,00013		
Total (Corr.)	4360,38	9			

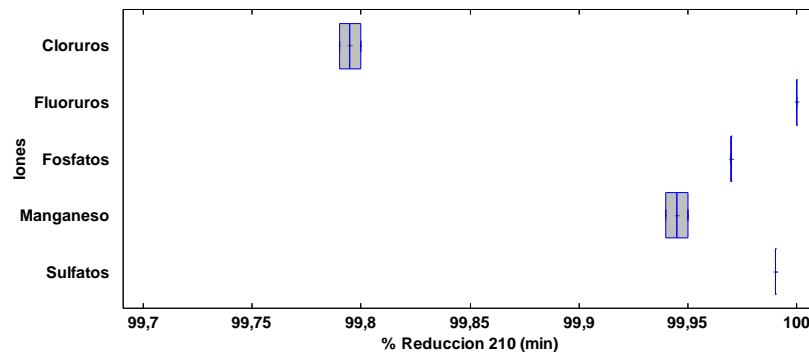


Figura 10.1. Grafica de caja y bigotes para %Reducción durante el tratamiento foto-Fenton

## ANEXO 11. Analisis ANOVA - Ensayo del efecto de factores: CaClO<sub>2</sub>, pH

Tabla 11.1. Análisis de Varianza para porcentaje de Inhibición (45 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	6,38021	1	6,38021	16,75	0,0064
B:CaClO <sub>2</sub>	198,535	1	198,535	521,22	0,0000
AB	7,16107	1	7,16107	18,80	0,0049
bloques	2,24232	2	1,12116	2,94	0,1286
Error total	2,28542	6	0,380903		
Total (corr.)	216,604	11			

R-cuadrada = 98,9449 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,0656 porciento

Error estándar del est. = 0,617173

Error absoluto medio = 0,405

Estadístico Durbin-Watson = 2,34258 (P=0,5307)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,246078

Tabla 11.2. Análisis de Varianza para porcentaje de Inhibición (30 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	167,627	1	167,627	65,50	0,0002
B:CaClO <sub>2</sub>	96,1634	1	96,1634	37,57	0,0009
AB	925,236	1	925,236	361,53	0,0000
bloques	17,4749	2	8,73743	3,41	0,1023
Error total	15,3555	6	2,55926		
Total (corr.)	1221,86	11			

R-cuadrada = 98,7433 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,696 porciento

Error estándar del est. = 1,59977

Error absoluto medio = 0,925556

Estadístico Durbin-Watson = 2,09923 (P=0,3756)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,118883

Tabla 11.3. Análisis de Varianza para porcentaje de Inhibición (10 min)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	1079,96	1	1079,96	36,00	0,0010
B:CaClO <sub>2</sub>	388,741	1	388,741	12,96	0,0114
AB	1940,05	1	1940,05	64,67	0,0002
bloques	148,725	2	74,3626	2,48	0,1642
Error total	180,003	6	30,0005		
Total (corr.)	3737,49	11			

R-cuadrada = 95,1839 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91,1704 porciento

Error estándar del est. = 5,47727

Error absoluto medio = 3,09097

Estadístico Durbin-Watson = 2,26965 (P=0,4833)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,203455

**Grafica efecto principales para los factores CaClO<sub>2</sub> y pH.**

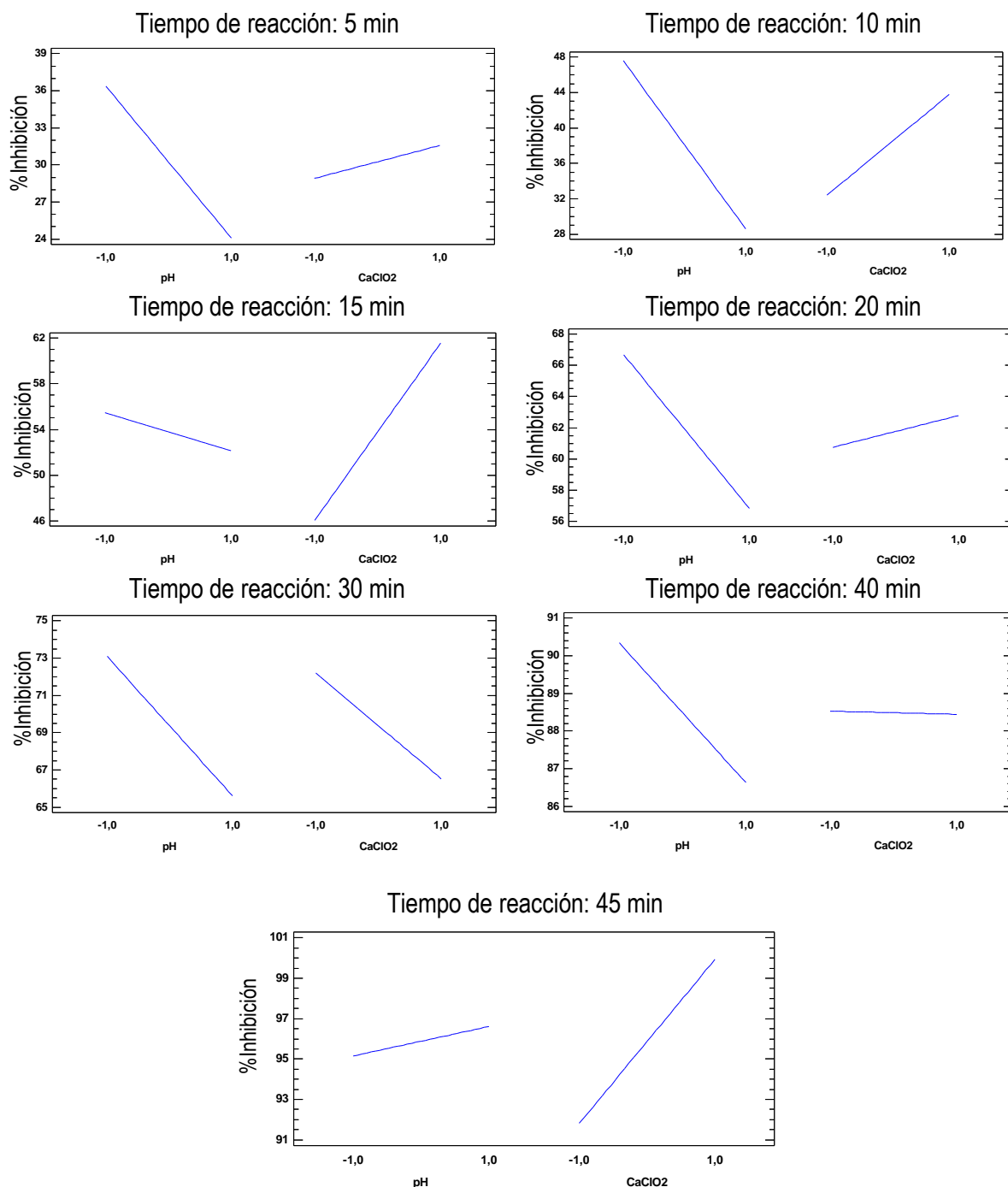


Figura 11.1. Diagrama de Efectos principales obtenido para la determinación de la significancia los factores pH y  $\text{CaClO}_2$  en el porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana *E. coli* K12 luego del tratamiento Cloración a pH cercano a la neutralidad

## Anexo 12. Resultados de la cinética del proceso foto-Fenton a pH cercano a la neutralidad

Tabla 12.1. Cinética de desinfección de *E. coli* K12 mediante foto Fenton (pH 6,78 unidades)

Tiempo	R4a		R4b		R4c		Promedio (N)	1/Co
	log	% I	log	% I	log	% I		
0	6,86	0,00	7,07	0,00	7,11	0,00	7,01	0,14
45	6,27	8,54	5,74	16,28	5,91	13,85	5,98	0,17
90	3,05	55,52	3,48	49,31	3,40	50,46	3,31	0,29
180	3,00	56,27	3,30	51,88	3,23	52,91	3,18	0,31
270	2,30	66,46	2,22	67,61	2,70	60,65	2,41	0,42
360	0,00	100,00	0,00	100,0	0,00	100,0	0,00	-

Tabla 12.2. Caracterización Microbiológica del agua subterránea

Parámetro	Enterobacterias T (UFC/100 ml)	Coliformes T (UFC/100 ml)	Coliformes F (UFC/100 ml)	Enterococos (UFC/100 ml)	Fagos (UFC/100 ml)	<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)
<b>Tiple Abajo</b>						
Promedio	2,36E+06	8,58E+03	3,75E+02	9,60E+02	8,60E+01	0,00E+00
%CV	4,21E+02	2,24E+02	1,46E+02	1,57E+02	2,47E+02	0,00E+00
Rango	0 - 5,18E+07	0 - 7,64E+04	0 - 1,59E+03	0 - 5,45E+03	0 - 6,82E+02	0,00E+00
<b>La Regina</b>						
Promedio	2,97E+05	3,06E+04	3,47E+03	4,15E+02	1,02E+02	0.15
% CV	3,16E+02	2,02E+02	2,18E+02	1,91E+02	2,19E+02	2,45E+02
Rango	2,80E+01 - 3,41E+06	2,80E+01 - 2,00E+05	0 - 2,27E+04	0 - 2,73E+03	0 - 6,36E+02	0 - 1,00E+00
<b>Palmaseca</b>						
Promedio	5,93E+05	8,25E+04	1,30E+02	2,60E+01	0,00E+00	5,30E+01
% CV	1,84E+02	1,82E+02	1,67E+02	2,50E+02	0,00E+00	2,65E+02
Rango	1,11E+02 - 2,94E+06	1,60E+01 - 4,10E+05	0 - 5,91E+02	0 - 1,71E+02	0,00E+00	0 - 3,66E+02

Enterobacterias T: Enterobacterias totales - Coliformes T: Coliformes totales - Coliformes F: Coliformes fecales - CV: Coeficiente de variación  
Fuente: Mejía (2014)

### ANEXO 13. Grafica de Pareto para los factores $\text{CaClO}_2$ y pH.



A partir de la Figura 5, se observa que se alcanza la mayor eficiencia de inhibición de la cepa *E. coli* K12 en el tratamiento R-3 (pH 6,78 unidades, y cloro 6,5 mgL<sup>-1</sup>), siendo este valor igual a 54,14%, mientras el menor porcentaje de inhibición celular se obtuvo con la combinación de factores en el tratamiento F.F – R2 (pH 6,78 unidades, y cloro 6,0 mgL<sup>-1</sup>) alcanzando un valor de 14,25%. Lo anterior puede deberse a la mayor presencia del ácido hipocloroso (HOCl) como el ión hipoclorito (OCl<sup>-</sup>). Cuando el valor de pH del agua clorada es 6.78, el 75% de la concentración de cloro presente será ácido hipocloroso no disociado y el otro 25% será ión hipoclorito. La Figura 13.1. muestra el diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de inhibición de la cepa *E. coli* K12.

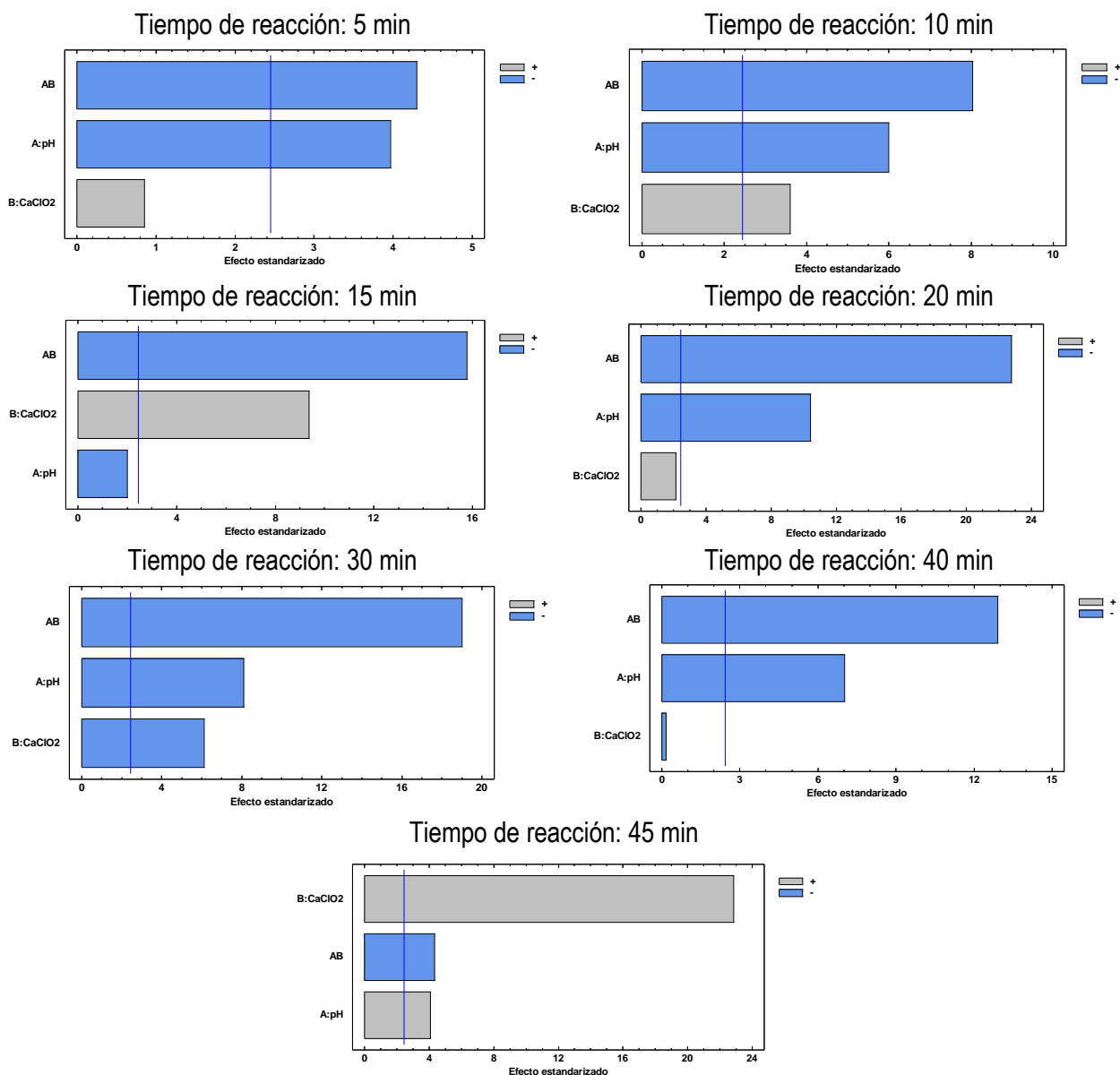


Figura 13.1. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido para la determinación de la significancia de los factores pH (A) y Cloro (B) en el porcentaje de inhibición de la cepa bacteriana *E. coli* K12 para los tiempo 5,

10, 15, 20, 30, 40 y 45 minutos del tratamiento Cloración a pH cercano a la neutralidad. El valor límite de la significancia está indicado por la línea vertical

Los diagramas de Pareto presentados en la Figura 13.1 muestran que durante los 45 minutos de reacción, el efecto combinado de factores pH y Cloro tiene la mayor significancia en el proceso, generando un impacto negativo en la eficiencia de inhibición celular. El factor pH posee el segundo nivel de significancia generando un impacto negativo, esto sugiere que el incrementar este factor del nivel negativo al positivo se reducirá el porcentaje de inhibición celular.

Para los tiempos 10, 15 y 45 minutos el factor Cloro alcanza valores de significancia en la reacción generando un impacto positivo, esto sugiere que al incrementar el Cloro del nivel bajo al nivel alto, el rendimiento se incrementó en los tiempos evaluados.

Con el fin de ampliar el análisis de la influencia individual de cada factor, en el Anexo 11 se presenta los efectos principales de los factores pH y Cloro.

En la Figura 13.1 se observa que para los tiempo 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos del tratamiento el efecto del pH es negativo, es decir, a mayor concentración de éste factor existe una menor eficiencia del porcentaje de inhibición celular, lo anterior está asociado a que el ácido hipocloroso se encuentra a mayor concentración a pH ácido y esta es la forma de cloro más eficiente en la desinfección. Al final del tratamiento tiempo 45 min el pH presentó un efecto positivo, esto sugiere posiblemente un aumento en el porcentaje de inhibición celular si se aumenta el nivel del pH.

Finalmente, el factor Cloro para los tiempos 5, 10, 15, 20 y 45 minutos del tratamiento el efecto del factor es positivo, es decir, a menor concentración de Cloro se genera una menor eficiencia del porcentaje de inhibición celular.

#### ANEXO 14. Esquemas metodológico para los recuentos celulares por los métodos RCP y DVC-FISH

Ensayos de desinfección - irradiación a reactores con una concentración de *E.coli* entre  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL, ajustada con escala McFarland



